BEEINFLUSSUNG DER ÖSTRADIOL-OXYDATION MIT BIOLOGISCH UNWIRKSAMEN STEROIDEN

Ein Beitrag zum biochemischen Antagonismus
von Hydroxy- und Keto-Steroiden

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Mützel
aus Berlin

Berlin 1970

BEEINFLUSSUNG DER ÖSTRADIOL-OXYDATION MIT BIOLOGISCH UNWIRKSAMEN STEROIDEN

Ein Beitrag zum biochemischen Antagonismus
von Hydroxy- und Keto-Steroiden

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Mützel
aus Berlin

Berlin 1970

1. Gutachter : Prof. Dr. M. W e n z e l
2. Gutachter : Prof. Dr. G. S c h e n c k

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.Juli 1970

Tag der Promotion:

14. JULI 1970

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof.Dr. M. W e n z e l in der Radioisotopenabteilung des Pharmazeutischen Institutes der Freien Universität.

Herrn Prof.Dr. W e n z e l bin ich für das große Interesse,das er meiner Arbeit entgegen brachte, und für wertvolle Anregungen und Diskussionen aufrichtig dankbar.

Meinem Lehrer,Herrn Prof.Dr. S c h e n c k, danke ich ebenfalls für sein Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Direktor Prof.Dr. H. G i b i a n, Leiter der pharmazeutisch-chemischen Forschung der Schering AG , Berlin, danke ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ferner Fräulein B. B o l l e r t für ihre technische Hilfe.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0029

INHALT

	Seite
A. Einführung und Problemstellung	1
B. Einleitender Überblick	3
C. Spezieller Teil : Ergebnisse	
C.1. Suche nach konstitutiven Gesetzmäßigkeiten für eine optimale Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Steroide	7
C.1.1 Prüfung der biologischen Reduzierbarkeit der 4-en-3-Keto-Gruppe von Steroiden durch optische Methoden	7
C.1.2. Prüfung auf Reduktion der 4-en-3-Keto-Gruppe von Steroiden mit Östradiol-17α-T als Wasserstoff-Donator	10
C.1.3. Konstitutive Bedingungen für die Steroidreduktion mit Östradiol-17α-T als Wasserstoff-Donator	11
C.2. Die 17-Ketone von Androsten-(2) und Androsten-(3) als Beispiele für biologisch unwirksame Steroide mit hoher Akzeptor-Effektivität	16
C.2.1. Allgemeine Steroid-Beschreibung und Synthese von 4-^{14}C-5α-Androsten-(3)-on(17)	16
C.2.2. Stoffwechsel und Identifizierung der Metaboliten	17
C.2.3. Ausarbeitung optimaler Reaktionsbedingungen für die Tritium-Übertragung im Lebergewebe	23
C.2.4. Die Selektivität von Östradiol-17α-T als Tritium-Donator im Vergleich zu Lactat-2-T und Isocitrat-2-T	34
C.2.5. Die Gewebespezifität der Tritium-übertragung	37

	Seite
C.3. Der Einfluß von Androsten-17on auf den Stoffwechsel des Östradiol in vivo	47
C.3.1. Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Androsten-17on: Nachweis durch Metaboliten-Analyse im Harn	47
C.3.2. Beschleunigte Östradiol-Oxydation in vivo bei Anwesenheit von Androsten-17on	51
C.3.3. Beeinflußt Androsten-17on die östrogene Wirkung von Östradiol auf den Uterus ?	53
D. Diskussion	55
E. Material und Methodik	61
E.1. Material	61
E.2. Methodik	68
F. Zusammenfassung	77
G. Literatur	79

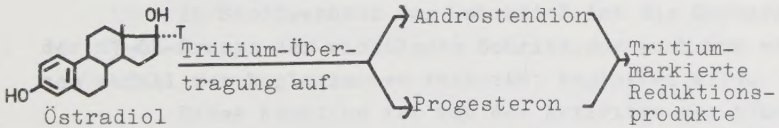
A.EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Wenzel et al. fanden 1967-1969 eine spezifische Wasserstoff-Übertragung von Östradiol bei dessen Oxydation in weiblicher und männlicher Rattenleber auf Androstendion und Progesteron(Lit.44,49,58).

1.Bei der Inkubation von Östradiol-17α-T und Androstendion mit Leberschnitten wurden 10-30 % der eingesetzten Aktivität in Reduktionsprodukten des Androstendions wiedergefunden.

2.Während bei der Inkubation von Progesteron in Schnitten weiblicher Rattenleber nur wenig 20α-Hydroxy-4-pregnen-3-on gebildet wird, steigt dessen Anteil auf das Zwanzigfache an, wenn Östradiol gleichzeitig anwesend ist,wobei auch hier der reduzierende Wasserstoff vom Östradiol kommt.

Beide Reaktionen laufen nach folgendem Schema ab:



T-DONATOR T-AKZEPTOREN

Ferner wurde die hohe Spezifität der Wasserstoff-Übertragung von Östradiol auf andere hormonal aktive Steroide im Vergleich zu anderen biologischen Wasserstoff-Donatoren in diesen Arbeiten bewiesen.Das führte zur Diskussion darüber,ob es sich hierbei um ein Regulationsprinzip des Östradiol-Stoffwechsels oder der Hydroxy- bzw.Keto-Steroide schlechthin handle.

Während der Wasserstofftransfer zwischen Östradiol und Androstendion bzw. Progesteron in vitro eingehend geprüft wurde, sind Versuche über den Einfluß dieser Steroide auf die Östradiol-Oxydation in vivo bisher nicht unternommen worden. Allerdings wäre bei einer Beeinflussung des Östradiol-Stoffwechsels mit diesen Steroiden in vivo stets mit Nebenwirkungen zu rechnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, einmal unter in-vitro-Bedingungen mit biologisch unwirksamen Steroiden eine Wasserstoffübertragung vom Östradiol her zu erreichen. Zum anderen sollte versucht werden, mit diesen Steroiden in den Östradiol-Stoffwechsel in vivo einzugreifen.

Da die Östradiol-Oxydation am C-17 mit einer Verringerung der östrogenen Wirkung einhergeht, schien die Prüfung biologisch unwirksamer Steroide als spezifische Oxydationsmittel für Östradiol auch vom therapeutischen Gesichtspunkt her interessant.

B. EINLEITENDER ÜBERBLICK

Hormone sind körpereigene Regulationsstoffe, die in kleinsten Mengen wirken.Eine wirksame Regulation ist natürlich nur möglich, wenn die Hormone aus der Blutbahn wieder entfernt werden, denn sonst würde der Organismus auf die Dauer von Hormonen überschwemmt. Die Untersuchung der biochemischen Wege der Synthese wie des Abbaus der Hormone ist ein interessantes Kapitel des intermediären Stoffwechsels.

Für die Sexualhormone ist der Hauptort des Stoffwechsels die Leber.Sie verfügt - teils in den mikrosomalen Strukturen,teils in der löslichen Plasmafraktion - über Enzymsysteme,die sämtlich stereospezifisch arbeiten und teilweise eine hohe Substratspezifität aufweisen.(Lit. 23,24,25,26,27,28)

Außerdem weist der Abbau von Steroidhormonen in der Leber der in dieser Arbeit als Versuchstiere benutzten Ratten geschlechtsspezifische Unterschiede auf. (Lit. 29,30,31,32)Daß die Hydroxylierung von Arzneimitteln und Steroidhormonen zum Teil durch dieselben enzymatischen Systeme in der Mikrosomenfraktion der Rattenleber katalysiert wird,ist wahrscheinlich (Lit. 33).

Im Stoffwechsel von Östradiol ist die Oxydation der 17-OH-Gruppe der wichtigste Schritt,der auch von einem Abfall der biologischen Aktivität begleitet wird.

Diese Reaktion ist von der Aktivität der 17ß-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase abhängig,die NAD bzw. NADP als Coenzyme braucht (Lit.1).Die Aktivität des Enzymes ist species-,organ- und geschlechtsabhängig.(Lit. 2,3, 4,5,)

Im Stoffwechsel androgener Hormone gelten die Hydrierung im Ring A durch Ring-A-Reduktasen und die Reduktion der Oxogruppen an den C-Atomen 3 und 17 durch Steroid-Dehydrogenasen als wichtigste Stoffwechselwege. (Lit. 12,13)

Diese Veränderungen führen zu biologisch weitgehend oder vollständig inaktiven Steroid-Derivaten und bereiten die Ausscheidung vor.

Die Ring-A-Steroid-Reduktasen katalysieren die irreversible Reduktion der 3-4-Doppelbindung eines Androgens,wobei sie ausschließlich NADPH als wasserstoffübertragendes Coenzym benötigen. (Lit.14,15,16) Reversibel sind dagegen Oxydo-Reduktionen der 3- bzw. 17-Hydroxysteroid-Oxydo-Reduktasen.Sie reagieren sowohl mit NADH als auch mit NADPH als wasserstoffübertragende Coenzyme.(Lit. 17,18,12,20,21,22)

Ein weiteres interessantes Kapitel ist das Problem der Wirkungsweise von Steroidhormonen. Als chemischer Stoff kann ein Hormon eigentlich nur chemische Wirkungen haben; es muß irgendwelche chemische Vorgänge beeinflussen.(l.c.Lit.37) Die "physiologischen Wirkungen",die man beobachtet,sind meist späte Folgen dieser Primärwirkung. Als Hauptwirkmechanismus wird heute die von Clever und Karlson entdeckte Aktivierung bestimmter Genorte angesehen, die zur Bildung entsprechender Enzyme in den Zielorganen der Hormonwirkung führt.Man nimmt dabei an, daß sich das Hormon mit einem Repressormolekül,wahrscheinlich einem Protein,verbindet.Dadurch wird die bisher blockierte DNS freigelegt,die Synthese von messenger-RNS kommt in Gang, und an den Ribosomen wird schließlich das Enzymprotein gebildet.So ließ sich zeigen, daß isolierte Zellkerne durch Inkubation mit Hormonen zur RNS-Synthese angeregt wurden.

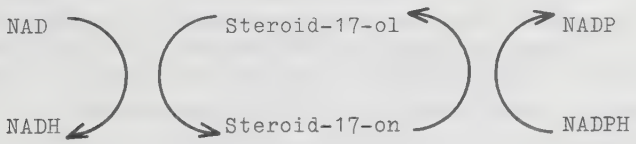
Eine wichtige Möglichkeit, tiefer in den Wirkungsmechanismus dieser Stoffklasse einzudringen, ist die Untersuchung solcher Fermente, die durch Hormone in ihrer Aktivität beeinflußt werden.

So konnte aus menschlicher Placenta eine östradiolabhängige Transhydrogenase isoliert werden (Lit. 19,20), welche Wasserstoff von NADPH auf NAD überträgt: Diese Transhydrogenase und ihre mögliche Bedeutung für den Wirkungsmechanismus des Östradiols in vivo ist

Gegenstand eingehender Diskussionen in der Literatur (Lit.36,22,44).Nach neuesten Untersuchungen ist ihre zellphysiologische Bedeutung umstritten.

Die von Hecker (Lit.39) ermittelten Zusammenhänge zwischen hemmender und aktivierender Struktur und Wirkung legen die Vermutung nahe, daß für die Bildung des Wasserstoff-Enzym-Komplexes vorzugsweise ,aber nicht ausschließlich die phenolische OH-Gruppe in 3-Stellung von Bedeutung ist.Für die Aktivierug der Transhydrogenasereaktion scheint allein das Vorhandensein einer 17ß-Hydroxy- oder 17-Oxo-Funktion wichtig,ohne daß das Steroid östrogen wirken muß.Damit kann es sich bei der Transhydrogenasewirkung von Steroiden,insbesondere der Östrogene,stets nur um einen möglichen Wirkungsmechanismus handeln.

Bei der Transhydrogenasefunktion des Östradiols ist die Hydroxylgruppe in 17-Stellung selbst am Wasserstofftransport beteiligt,so daß man Steroid-Oxydoreduktion und Transhydrogenasereaktion mit folgendem Schema beschreiben kann:



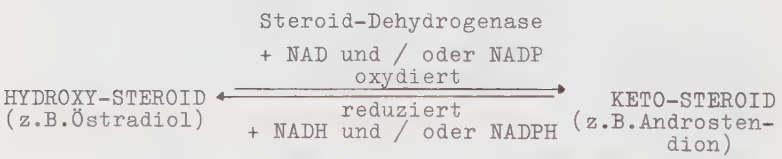
Die Richtung des Wasserstofftransportes und die Gleichgewichtslage (Redox-Verhältnis) zwischen den Steroiden muß sich gemäß dem Massenwirkungsgesetz nach den vorhandenen Konzentrationen der Partner richten.So wird in einem NADPH-generierenden System die ol-Form des Steroides überwiegen,während sich die Richtung des Wasserstofftransportes bei Kopplung des Systems an die NADPH-verbrauchende Fettsäurebiosynthese umkehren läßt, wenn man mit Substratmengen von NADH arbeitet.(Lit.40)

Die dieser Arbeit als Ausgangspunkt dienenden

Ergebnisse von Wenzel et al. über den spezifischen Wasserstofftransfer zwischen Steroiden (siehe Einleitung),lassen es aber zweifelhaft erscheinen,ob wirklich jedes NADPH- oder NADH-generierende System mit der gleichen Effektivität in das Gleichgewicht zwischen 17-Hydroxy- und 17-Keto-Steroid eingreifen kann,da bei den beschriebenen Reaktionen aus Hydroxy-Steroiden entstandenes NADPH einen wesentlich größeren Einfluß auf die Reduktion von Keto-Steroiden hat, als andere NADPH-generierende Systeme.

Dementsprechend sind die Befunde zur Wasserstoffübertragung von Östradiol auf Androstendion bzw. Progesteron nicht als Beweis für die Transhydrogenase-Funktion der Hydroxy-Steroide anzusehen.

Die Versuche von Wenzel et al. zeigen eher einen "biochemischen Antagonismus" von Hydroxy- und Keto-Steroiden auf.Dabei stehen sich zwei verschiedene Steroide gegenüber,die sich in ihrem Zwischen-Stoffwechsel gegenseitig nach folgendem Schema beeinflussen:



Dabei wurde durch stoffwechsellabile Tritiummarkierung die enge Beziehung der Oxydoreduktion der Steroide untereinander bekannt,die durch andere NAD- oder NADP-abhängige Redoxpartner bei weitem nicht erreicht wird.

Als Folge dieser Befunde wurde die mögliche Beeinflussung des Stoffwechsels eines Steroids,hier des Östradiols, durch die Anwesenheit eines zweiten,reduzierbaren Steroids diskutiert.Einen Beitrag zu dieser Diskussion soll die vorliegende Arbeit bringen.

Dabei wird aufgezeigt werden, an welche konstitutiven Voraussetzungen der Wasserstofftransfer zwischen Steroiden gebunden ist,und erstmals bewiesen,daß dieser Wasserstofftransfer auch in vivo abläuft.

C. SPEZIELLER TEIL : ERGEBNISSE

C.1. Suche nach konstitutiven Gesetzmäßigkeiten für eine optimale Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Steroide

C.1.1. Prüfung der biologischen Reduzierbarkeit der 4-en-3-Keto-Gruppe von Steroiden durch optische Methoden

Ringold et al. (Lit.41,42) fanden, daß durch die Einführung negativer Substituenten bei Steroiden in die Positionen C-2,C-4,C-6α oder C-6ß,sofern sie 4-en-3-Keto-Struktur haben, nicht nur wesentlich schneller die Keto-Gruppe reduziert wird,sondern auch die Doppelbindung. Bei 6ß-halogensubstituierten Steroiden kommt es dadurch sogar zu einem "anomalen" Reduktionsverlauf: Es entsteht ein 4-en-3-ol-Steroid (l.c."allyl-alcohol-formation"). Anomal ist dieser Ablauf deshalb,weil zuerst beschleunigt und bevorzugt die Keto-Gruppe vor der Doppelbindung reduziert wird, während die Reihenfolge bei unsubstituierten und 6α-halogensubstituierten Steroiden umgekehrt ist.

Da Östradiol bei seiner Oxydation in der Rattenleber NADH und NADPH liefert,die Reduktion der 3-Keto-Gruppe aber von einer 3-Hydroxysteroid-Dehydrogenase,die entweder NADH- oder NADPH-abhängig ist,katalysiert wird, kann man sich vorstellen,daß der Wasserstoff-Akzeptor bei genügend hoher Konzentration sehr schnell die reduzierenden Coenzyme verbraucht,die der Redox-Partner Östradiol liefert.Vorausgesetzt,daß die Enzymaktivitäten aller in Frage kommenden Steroid-Oxydo-Reduktasen etwa gleich sind, dann liegt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Wasserstoffabgabe bzw. -aufnahme: Man müßte mit einem schnell reduzierbaren (s.o.) Steroid ein anderes schneller oxydieren können.

Die Tatsache also,daß die Reduktion der 4-en-3-Keto-Struktur von den gleichen Coenzymen abhängig ist,welche bei der Oxydation von Östradiol-17ß-OH gebildet werden, und deren besonders hoher Verbrauch pro Zeit bei der Reduktion von Steroiden mit elektronegativen Substituenten,veranlaßten zu dem Versuch,mit solchen Steroiden in die Oxydation des Östradiols einzugreifen.

Zuerst wurde die Geschwindigkeit und das Ausmaß der enzymatischen Reduktion der 4-en-3-Keto-Gruppe einiger Steroide in Homogenat weiblicher Rattenleber geprüft.

Herausgesucht wurden dafür: +)

a.Steroide mit elektronegativen Substituenten in C-2α,C-4,C-6α oder 6ß (Material-Zeichen 4Cl,14,15,16, 17,18),von denen bislang keine biologische Wirkung bekannt war.

b.Steroide, die keine biologische Wirkung haben sollten, aber im Ring A normal reduzierbar sein sollten (Zeichen : 4 A,4 P,11,12,13).

Als Maßstab für die Reduzierbarkeit wurde der Schwund der 4-en-3-Keto-Gruppe (chromophore Gruppe) durch UV-Messung genommen .Jedes der Steroide hat ein oder mehrere Extinktionsmaxima im UV-Bereich ,deren Höhen konzentrationsabhängig sind.Ändert man die chromophore Gruppe durch enzymatische Reduktion, so sinkt die Extinktion. (Vergl. Methodik B.4.)

Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt(Abb.1), daß die Steroide mit Halogensubstituenten schneller reduziert wurden als ohne diese Substituenten,auch wenn diese hoch wirksam sind,wie Testosteron und Androstendion.

Besonders schlecht schneiden bei diesem Reduktionstest Steroide ab,die in den Ringen A und B doppelt

---

+) Herrn Privatdozent Dr.R. W i e c h e r t, Leiter der Steroidchemie der Schering AG,Berlin, danke ich für die großzügige Überlassung der Steroide.

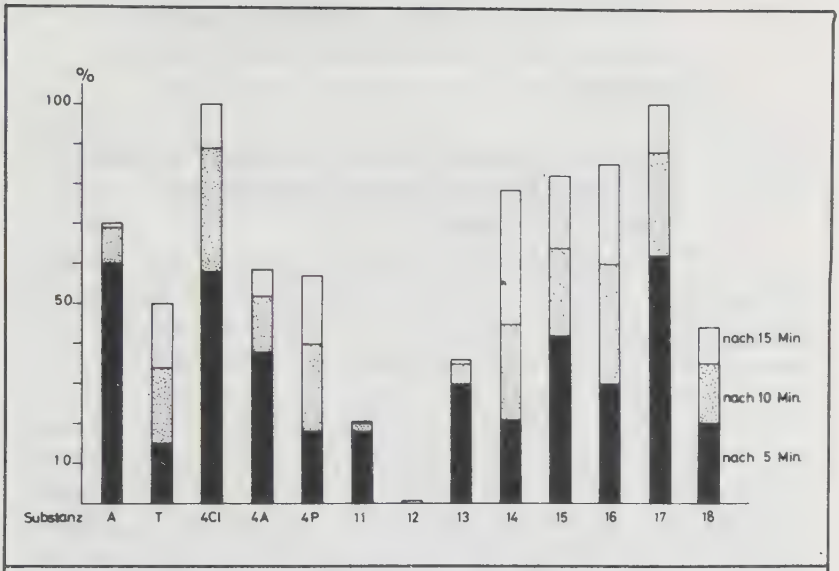


Abb.1 :Der prozentuale Schwund der 4-en-3-Keto-Gruppe bei Steroiden nach Inkubation mit weiblicher Rattenleber.

Inkubationsbedingungen: je 100 mg Leber in 4,0 ml Tris-HCl-Puffer homogenisiert.Steroidkonzentrationen: je 100 µMol/l,Temp.: 37° C, Dauer: s. Balkenfelder.-Die Werte sind auf 100 % Wiederfindung korrigiert.
Steroide: s. Tabelle 8

oder dreifach konjugierte Systeme haben,die offenbar zu stabil sind,um sich enzymatisch reduzieren zu lassen (Substanzen 11,12,13).Ähnlich gut wie Androstendion ließen sich dagegen Androsten-3on und Pregnen-3on reduzieren.

Bei der Extinktionsmessung der obengenannten Steroide wurde jeweils nur der u n veränderte Anteil erfaßt (vergl. Methodik).

Daß der Schwund der 4-en-3-Keto-Gruppe durch Reduktion und nicht durch Adsorption der unveränderten Steroide an das Homogenateiweiß

erfolgte,konnte durch Kontrollversuche mit bei 70° C inaktiviertem Leberhomogenat gezeigt werden.(Hitze-Inaktivierung der Leberenzyme)

C.1.2. Prüfung auf Reduktion der 4-en-3-Keto-Gruppe von Steroiden mit Östradiol-17α-T als Wasserstoff-Donator

Zu gleichen Leberhomogenat-Ansätzen,die für die UV-Messungen verwendet wurden, wurde als NADT- bzw. NADPT-Generator Östradiol-17α-T in 10 % der Akzeptor-Steroid-Konzentration dazugegeben, um so das Maß der Wasserstoff-Übertragung vom Östradiol zu prüfen.

Trotz intensiver Variation der Versuchsbedingungen (pH,verschiedene Puffersysteme,Inkubationszeit und -temperatur),war bei den genannten,biologisch unwirksamen Steroiden nur ein Tritium-Einbau von 0,1 % der eingesetzten Aktivität in Reduktionsmetabolite feststellbar.In Reduktionsprodukte des Androstendions waren dagegen unter den gleichen Bedingungen wie bei der UV-Messung 22,3 % der Tritium-Aktivität eingebaut (Testosteron und Androstandiole).

Interpretiert könnte dieses unerwartete Ergebnis wie folgt werden:

a.Steroide akzeptieren NADT/NADPT von Östradiol-17α-T nur,wenn sie androgene Wirkung haben.

b.Die Kompartimentierung in der Zelle ist so groß,daß von Östradiol-17α-T gebildetes NADT/NADPT nicht direkt zum entfernt liegenden Ring A gelangen kann.

c.Enzym-Coenzym-Bindungen sind so stark,daß ein Austausch von Coenzymen schwer möglich ist.

Als mögliche Tritium-Akzeptoren wurden ferner drei Steroide ausprobiert,die bei der Therapie hormonabhängiger Tumoren verwendet werden: "Ultandren"(Ciba),"Fludestrin"(Squibb) "Triamcinolon"(Squibb).
Alle vermögen auf die direkte Oxydation des Östradiols nicht einzuwirken.

C.1.3. Konstitutive Bedingungen für die Steroid-Reduktion mit Östradiol-17α-T als Wasserstoff-Donator

Daß die Akzeptorwirkung eines Steroides, das Wasserstoff aus der Oxydation von Östradiol stammend bei seiner eigenen Reduktion übernehmen soll, nicht mit seiner androgenen Wirkung korreliert ist, wurde mit Testosteron bewiesen: Im Vesikulardrüsen-Test nach Löwe und Voss (Lit.43) ist Androstendion zwanzigmal schwächer androgen wirksam als Testosteron, baut aber bei der Reduktion des Ringes A und der Keto-Gruppen in C-3 und C-17 22,3 % der eingesetzten Aktivität ein, Testosteron aber nur 1,2 %.

Da die schon früher (Lit.44,45) gefundene Spezifität der Wasserstoff-Übertragung vom Östradiol durch die strenge Substratkompartimentierung in der Zelle erklärt wurde, sollte in diesem Abschnitt ferner geprüft werden, ob für den Wasserstofftransfer zwischen Steroiden zusätzlich besondere konstitutive Bedingungen des Akzeptor-Steroides erfüllt sein müssen. Muß sogar eine genaue sterische Ausrichtung der Steroidmoleküle im Bereich der Steroid-Dehydrogenasen vorhanden sein? Ist ein Wasserstofftransfer zwischen Steroiden nur möglich, wenn die reagierenden Gruppen bei beiden Steroiden am gleichen C-Atom liegen?

Um diese Möglichkeiten zu prüfen, wurde dem Östradiol-17α-T als Donator ein in Position C-3 tritiiertes Steroid als Wasserstoff-Donator gegenübergestellt: Ätiocholanolon-3α-T.

Das Ergebnis zeigt (Tab. 1), daß die im optischen Test als gut reduzierbar ausgemachten Steroide tatsächlich die Oxydation des Ätiocholanolons bewirken. Ätiocholanolon allein wird nur weniger zu HTO oxydiert als bei Anwesenheit der Akzeptor-Steroide. Außerdem wurden 5 - 10 % der eingesetzten Tritium-Aktivität jetzt auch auf Metabolite der Akzeptor-Steroide übertragen, wobei hier nicht geklärt wurde, ob das Tritium am C-3 oder in die 3-4-Doppelbindung eingebaut worden war.

Tabelle 1 :Tritium-Einbau in HTO und Metabolite gut reduzierbarer Steroide nach Inkubation mit Ätiocholanolon-3α-T in Homogenat von weiblicher Rattenleber.

Inkubationsansätze: je 100 mg Leber in 4ml Tris-HCl-Puffer homogenisiert und mit den Steroiden 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Steroid-Konzentrationen: Ätiocholanolon-3α-T: 132 µMol/l ,alle anderen Steroide (s.Tabelle 8): 100 µMol/l
Aufarbeitung vergl.Methodik,DC-Trennung: Laufmittel-System I

	wiedergefundene % d.einges.Akt.in:		
eingesetzt:	Et	HTO	Akzeptor-Metabolit
Ätiocholanolon-3α-T (Et)	77,8	5,3	---
Substanz 14 + Et	58,9	5,6	5,7
Substanz 15 + Et	36,2	10,0	10,1
Substanz 16 + Et	45,7	9,2	5,6
Substanz 17 + Et	51,0	6,5	7,5
Substanz 18 + Et	58,0	8,2	5,5

Besonderes Interesse wurde den sterischen Verhältnissen der Akzeptor-Steroide gewidmet.In gleichen Ansätzen mit Leberhomogenat weiblicher Ratten wurden die vier stereoisomeren Androstanolone und die beiden Androstandione als Tritium-Akzeptoren den Donatoren Ätiocholanolon-3α-T und Östradiol-17α-T gegenübergestellt.

Dabei wurde deutlich (Tabelle 2),daß Östradiol auf alle untersuchten 17-Keto-Steroide Tritium überträgt. Das Ausmaß der Übertragung hing offenbar von den sterischen Verhältnissen der Akzeptoren ab: Auf 5α-konfigurierte wurde besser der Wasserstoff übertragen als auf 5ß-konfigurierte Steroide,auf die hier geprüften Steroide mit einer OH-Gruppe in 3α-Stellung besser,als wenn diese in 3ß steht.Dabei nahm die HTO-Bildung nicht auf Kosten des Tritium-Einbaus in die Steroide ab.

Tabelle 2 :Verteilung der Tritium-Aktivität nach Inkubation von Östradiol-17α-T oder Ätiocholanolon-3α-T und stereoisomeren Androstan-Derivaten in Homogenat von Leber weiblicher Ratten.

Inkubationsansätze: je 100 mg Leber wurden in 4 ml Tris-HCl-Puffer,pH 7,45,homogenisiert und mit den in je 0,1 ml Äthanol gelösten Steroiden 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Steroid-Konzentrationen:Östradiol-17α-T:7,0 µMol/l,Ätiocholanolon-3α-T:66 µMol/l, alle anderen Steroide: 100 µMol/l
Aufarbeitung der Ansätze vergl.Methodik A.1.
DC-Trennung:Laufmittel-System I

		wiedergefundene % der eingesetzten Aktivität in:			
eingesetzt:		E_2	Et	HTO	Metabolit
Östradiol-17α-T (E_2)		78,5		5,8	
Ätiocholanolon-3α-T (Et)			70,5	10,5	
5α-Androstan-3αol-17-on	+E_2	38,8		4,0	56,5
(Androsteron)	+Et		61,2	6,2	16,8
5α-Androstan-3βol-17-on	+E_2	68,3		3,6	10,8
	+Et		72,2	9,8	--
5β-Androstan-3αol-17-on	+E_2	76,5		4,0	7,2
	+Et		74,4	6,8	--
5β-Androstan-3βol-17-on	+E_2	80,5		5,4	5,4
	+Et		82,3	1,1	--
5α-Androstandion(3,17)	+E_2	61,3		4,3	15,0
	+Et		59,8	9,9	40,8
5β-Androstandion(3,17)	+E_2	66,5		6,3	5,6
	+Et		77,0	3,0	--
Androsten(4)-dion(3,17)	+E_2	63,7		5,3	10,8
	+Et		67,7	8,5	2,1

Ätiocholanolon, selbst mit 5ß-Struktur (d.h. die Ringe A und B sind cis-verknüpft), übertrug sein Tritium von C-3 auf C-17 besser auf 5α-konfigurierte Steroide. Die Übertragung ging hier - im Gegensatz zum Östradiol - nur auf Kosten der HTO-Bildung und führte nur beim 5α-Androstandion zu einer vermehrten Oxydation des Ätiocholanolons. Steroide mit 5ß-Struktur und 3ß-Struktur übernahmen von Ätiocholanolon-3α-T keine meßbaren Mengen Tritium; sie verhinderten die Oxydation, was sich in der verminderten HTO-Bildung ausdrückte.

Nach Kenntnis dieser Verhältnisse wurden zusammenfassend vier Versuche durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 2. Mit ihm konnte bewiesen werden, daß die Spezifität der Tritium-Übertragung eng mit der identischen Lokalisation der beiden funktionellen Gruppen, die in ein Redox-Verhältnis eintreten sollen, zusammenhängt.

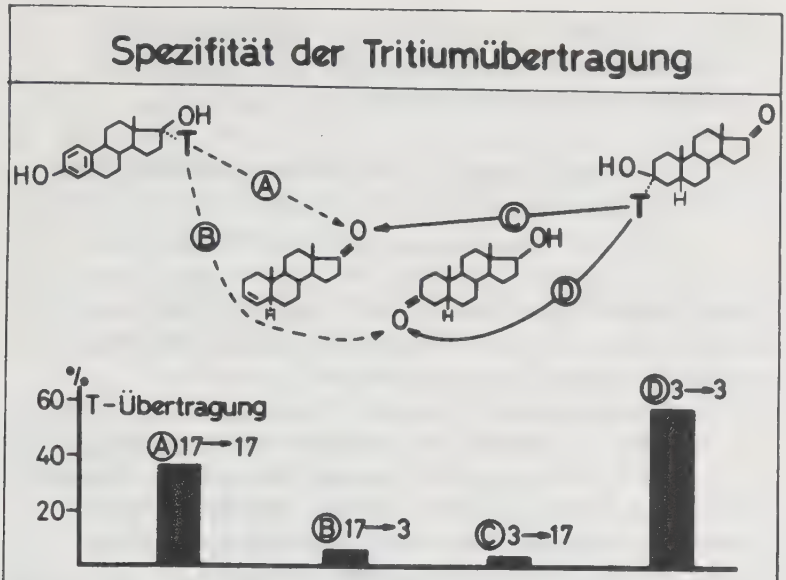


Abb.2: Spezifität der Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T und Ätiocholanolon-3αT auf 3- und 17-Keto-Steroide.

Ansätze: je 100 mg Leber einer weiblichen Ratte wurden in 4 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,45, homogenisiert und bei 37°C 30 Minuten inkubiert.
Steroidkonzentrationen: Östradiol-17α-T: 7,0 µMol/l
Ätiocholanolon-3α-T : 66 µMol/l
5α-Androsten-(3)-on(17) : 100 µMol/l
5α-Androstanon-(3)-ol(17) : 100 µMol/l

C.2. Die 17-Ketone von Androsten-(2) und Androsten-(3) als Beispiele für biologisch unwirksame Steroide mit hoher Akzeptor-Effektivität

C.2.1. Allgemeine Steroid-Beschreibung und Synthese von 4-^{14}C-5 -Androsten-(3)-on(17)

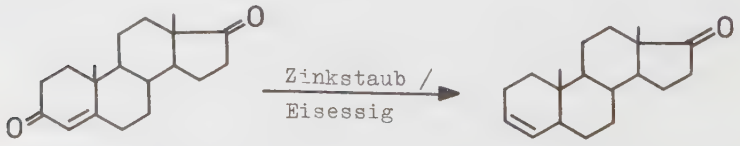
Aus den bisher gewonnenen Kenntnissen über die strukturellen Eigenschaften, die ein Steroid haben muß, um oxydationsfördernd auf Östradiol einzuwirken, wurden nun gezielt zwei 17-Keto-Steroide aus den zur Verfügung stehenden Möglichkeiten ausgesucht:

5α-Androsten-(2)-on(17) (Zeichen: Substanz 21)
5α-Androsten-(3)-on(17) (Zeichen: Substanz 22)

Wie in dem letzten Versuch des letzten Kapitels (vergl. Abb. 2) schon geklärt wurde, ist das 17-Keton des Androsten-(3) ein effektiver Tritium-Akzeptor in Rattenleber bei dem Donator Östradiol-17α-T.

Pharmakologisch wurde Substanz 21 von Dorfman (Lit.46) 1964 geprüft: Im Kükenkamm-Test zeigte sie eine androgene Wirkung von 0,04 x Testosteron. Mit dem gleichen Test, der im pharmakologischen Labor der Schering AG durchgeführt wurde, fand man für die Substanz 22 sogar nur eine androgene Wirkung von weniger als 0,01 x Testosteron. (Lit. 47)

Um den Stoffwechsel einer dieser Substanzen in der Rattenleber genauer zu studieren und um ferner die in Kapitel C.2.5. durchgeführten Versuche zu ermöglichen, wurde Substanz 22 mit dem Radioisotop ^{14}C nach der Vorschrift von McKenna (vergl. Steroide) erstmalig markiert hergestellt (Lit.48):



4-^{14}C-Androstendion

4-^{14}C-5 -Androsten-(3)-on(17)

Die Ausbeute der Umsetzung von 50 µCi/0,3 mg (≙ 56,6 mCi/mMol) 4-^{14}C-Androstendion zu reinem 4-^{14}C-5 -Androsten-(3)-on(17) betrug 24 % oder 12 µCi. Es wurden bei der Reaktion vier weitere,nicht identifizierte Produkte beobachtet, von denen durch Dünnschichtchromatographie in System V und Rechromatographie in System III abgetrennt wurde.

C.2.2. Stoffwechsel von Substanz 22 und Identifizierung der Metaboliten

Um zunächst den Stoffwechsel des Kohlenstoffgerüstes des Wasserstoff-Akzeptors Androsten-17on kennenzulernen,wurde die ^{14}C-markierte Substanz mit Leberschnitten weiblicher Ratten inkubiert.

Nach Aufarbeitung der Ansätze (vergl.Methodik) und anschließender Dünnschichtchromatographie, wurden neben dem eingesetzten Steroid zwei weitere radioaktive Maxima gefunden: In System III ein Metabolit mit dem R_f-Wert 0,44 und ein Metabolit mit dem R_f-Wert 0,31.

Aus den Eigenschaften des zuletzt genannten Metaboliten, acetylierbar zu sein (System IV,R_f 0,47) und gleichzeitig ein 2,4-Dinitrophenylhydrazon bilden zu können (System II, R_f 0,52 ; System I, R_f 0,61), wurde gefolgert,daß es sich um das 17-Keton mit einer weiteren Hydroxyl-Gruppe an einem nicht ermittelten C-Atom handelte.

Der zweite Metabolit mit dem R_f-Wert 0,44 in Laufmittel-System III entsprach dem aus den nach Leberinkubationen mit Östradiol-17α-T gebildeten tritiierten Metaboliten. Dieser konnte nach Tabelle 3 anhand des authentischen Vergleichs-Steroids als 5α-Androsten-(3)-ol(17) identifiziert werden.

Eine Zeitabhängigkeit der Umwandlung des Steroides Substanz 22 in Homogenat weiblicher Rattenleber in vitro gibt Abbildung 3 wieder.Danach wurde - auch bei Abwesenheit von Östradiol - der durch Reduktion entstehende Metabolit stärker als das hydroxylierte Produkt gebildet.

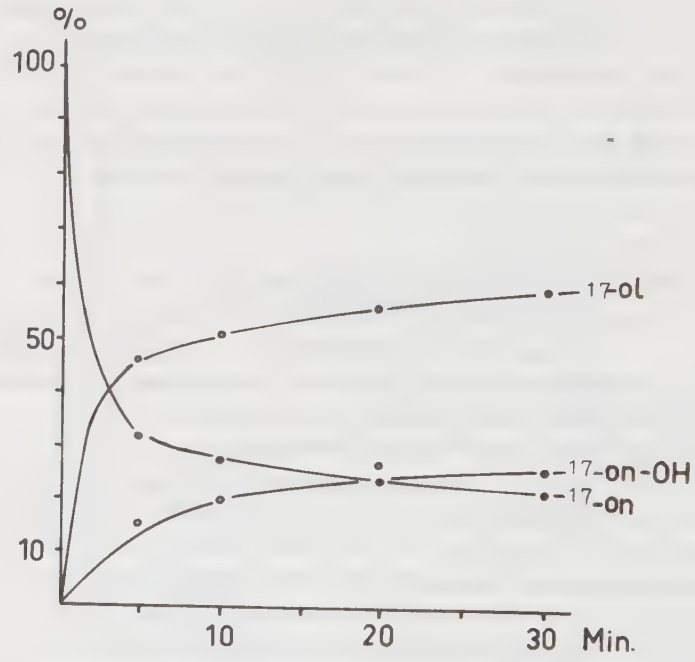


Abb. 3 :Zeitabhängigkeit der Metabolitenbildung aus 5α-Androsten-(3)-on(17)-4-^{14}C in weiblicher Rattenleber.

17-on = eingesetztes Steroid
17-on-OH = hydroxyliertes 17-Keton
17-OH = 5α-Androsten-(3)-ol(17)
Inkubationsansätze: 100 mg Leber einer weiblichen Ratte in 4 ml Tris-HCl-Puffer homogenisiert und verschieden lange bei 37°C inkubiert.
Aufarbeitung der Ansätze vergl.Methodik
Steroid-Konzentration: 0,134 µMol/l ≙ 0,032 µCi
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität

Das Entstehen weiterer Metabolite dürfte nach diesen in-vitro-Versuchen ausgeschlossen sein, da nach Aufarbeitung der Ansätze fast 100 % der eingesetzten ^{14}C-Aktivität wiedergefunden wurde.

Somit ist die Oxydo-Reduktion am C-Atom 17 auch im Zwischenstoffwechsel dieses biologisch unwirksamen Steroides der wichtigste Stoffwechselweg.

Allgemein wurden die bei den Inkubationen - insbesondere der mit Östradiol-17α-T gebildeten und mit Tritium markierten - Metabolite der Substanzen 21 und 22 durch Dünnschichtchromatographie abgetrennt und ihr Aktivitätsanteil mit dem Dünnschicht-Scanner bestimmt. (Vergl. Methodik)

Ein Original-Chromatogramm zur Aktivitätsverteilung auf Dünnschichtplatten zeigt Abb.4 als Beispiel für alle anderen derartigen Bestimmungen in dieser Arbeit.

Andere chemische und analytische Methoden (s.d.) wurden benutzt, um diese aus einer biochemischen Reaktion stammenden Substanzen zu definieren.

Der vollständige Gang zur Identifizierung ist in Tabelle 3 gezeigt, zu der auch die Abbildung 5 gehört.

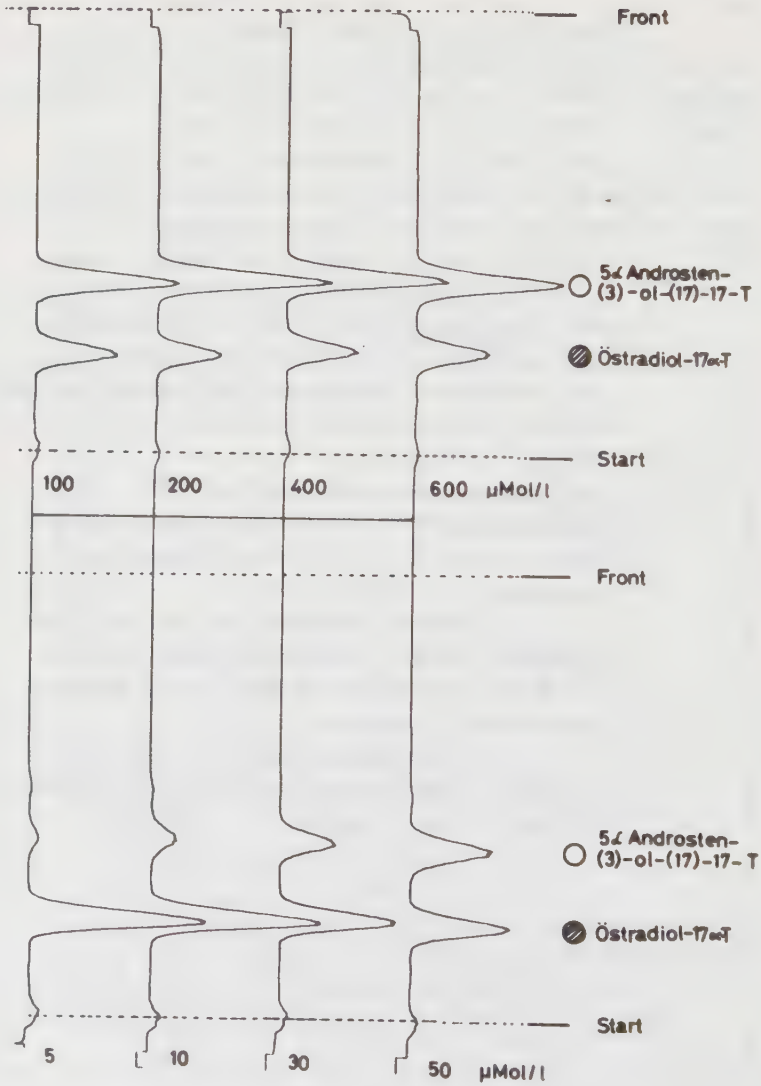


Abb. 4 :Verteilung von ^{3}H-Aktivität auf zwei Dünnschichtplatten nach Direktmessung mit dem Dünnschicht-Scanner,Fa. Berthold, mit Autochronschreiber.

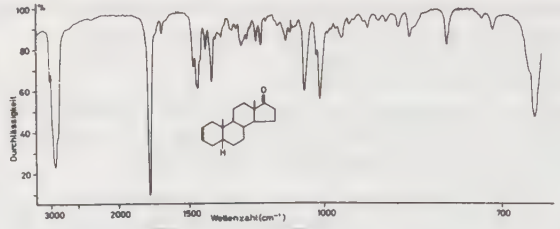
Die Kurve (Org.-Reproduktion) gehört zu einem Versuch zur Klärung der Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf steigende Konzentrationen von Androsten-(3)-on(17) in weiblicher Rattenleber.

Tabelle 3: Identifizierung von tritiummarkiertem 5α-Androsten-(2)-ol(17) und 5α-Androsten-(3)-ol(17)

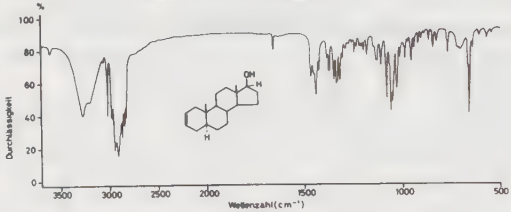
Beide Substanzen entstanden bei Inkubation der entsprechenden 17-Ketone mit Östradiol-17α-T in weiblicher und männlicher Rattenleber

Maßnahmen zur Identifizierung	Ergebnis zum Metaboliten der Substanz 21	Substanz 22
1. Dünnschichtchromatographie in Laufmittelsystem III	R_f-Werte der radioaktiven Maxima :	
	$0,42^{+})$	$0,44^{+})$
2. Rechromatographie der Peaks von 1 in System IV	R_f-Werte der radioaktiven Maxima :	
	$0,66^{+})$	$0,67^{+})$
3. Rechromatographie der Peaks von 2 in System V	R_f-Werte der radioaktiven Maxima :	
	$0,69^{+})$	$0,71^{+})$
4. Elution der radioaktiven Maxima mit Aceton, Mikroacetylierung, dann DC der Acetate in:	R_f-Werte der radioaktiven Maxima :	
a. System IV	0,16	0,17
b. System V	0,58	0,60
5. Elution der radioaktiven Maxima von 1 mit Aceton, Reduktion mit $NaBH_4$ in Methanol, dann DC der Reduktionsprodukte in :	R_f-Werte der radioaktiven Maxima :	
a. System IV	$0,34^{++})$	$0,35^{++})$
b. System V	0,54	0,56
6. Elution der radioaktiven Maxima von 1 mit Aceton, Oxydation mit CrO_3/Eisessig, dann Radioaktivitätsmessung der wäßrigen Phase und DC der Hexanphase in System III	R_f-Werte der inaktiven Substanzen aus Hexan:	
	$0,56^{+++})$	$0,58^{+++})$
	In der wäßrigen Phase waren % der Aktivität:	
	98,1	97,2
7. Elution der radioaktiven Maxima von 1 (ca 80 Ansätze) mit Aceton, im Luftstrom eingeengt, in 1 Tr. $CHCl_3$ aufgenommen, auf KBr-Pulver aufgetropft, 48 Stunden getrocknet, gepreßt und mit dem Preßling das IR-Spektrum aufgenommen.	Die IR-Spektren waren mit den Spektren authentischer Substanzen identisch. (siehe Abb. 5)	

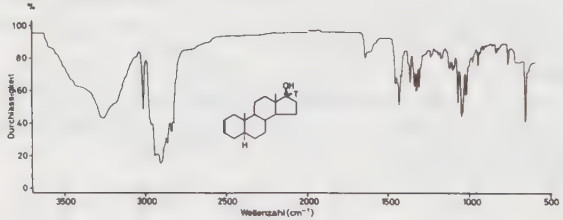
$^{+})$ identisch mit authentischen Substanzen
$^{++})$ Androstanole ?
$^{+++})$ identisch mit den authentischen 17-Ketonen



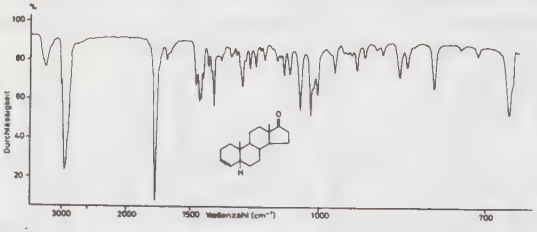
Substanz 21: 5α-Androsten-(2)-on(17), authentisch



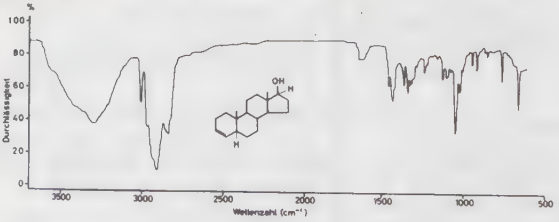
5α-Androsten-(2)-ol(17β), authentisch



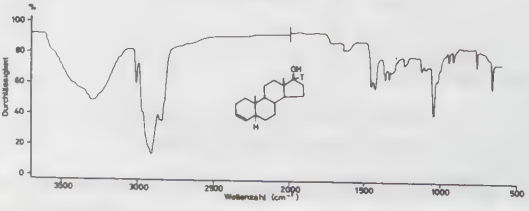
5α-Androsten-(2)-ol(17)-T, Stoffwechsel-produkt



Substanz 22: 5α-Androsten-(3)-on(17), authentisch



5α-Androsten-(3)-ol(17β), authentisch



5α-Androsten-(3)-ol(17)-T, Stoffwechsel-produkt

Abb. 5 : IR-Spektren

C.2.3. Ausarbeitung optimaler Reaktionsbedingungen für die Tritium-Übertragung im Lebergewebe

Um die oxydierende Wirkung der Substanzen 21 und 22 in Bezug auf Östradiol zu untersuchen, wurden

1.die optimalen pH-Bedingungen für die Östradiol-Oxydation und die Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf die Akzeptor-Steroide geprüft,

2.wurde die Östradiol-17α-T-Oxydation unter dem Einfluß der Substanzen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ermittelt,

3.wurde die Konzentration von Östradiol-17α-T bei gleichbleibender Akzeptor-Konzentration variiert und

4.der Einfluß der Akzeptor-Konzentration auf die Östradiol-Oxydation untersucht.

Zu1.: Zunächst wurden die optimalen pH-Bedingungen für die Östradiol-Oxydation mit besonderer Berücksichtigung auf die Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf die Akzeptor-Steroide geprüft.

Dabei wurde für die Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Substanz 22 in Leberhomogenat weiblicher Ratten festgestellt,daß der maximale Östradiol-Umsatz (gemessen an der Östradiol-Rückgewinnung) und die maximale HTO- und Metaboliten-Bildung im pH-Bereich 7,3 - 7,8 liegen.(Vergl.Abb. 6) Das gleiche pH-Optimum konnte auch für die Oxydation von reinem 4-^{14}C-Östradiol konstatiert werden.

Zu 2.: Es wurde die Östradiol-17α-T-Oxydation unter dem Einfluß der Substanzen 21 und 22 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ermittelt. Als Inkubationsmedien dienten Leberschnitte und -homogenate weiblicher und männlicher Ratten.

Abb. 7 und 8 zeigen,daß in Leberhomogenat nach 5 - 7 Minuten das Reaktionsgleichgewicht eingestellt ist. In Leberschnitten stellt sich das Gleichgewicht erst nach 15 - 20 Minuten ein.Ein Vergleich der Umsätze ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

Betrachtet man die HTO-Bildung,dann hat die

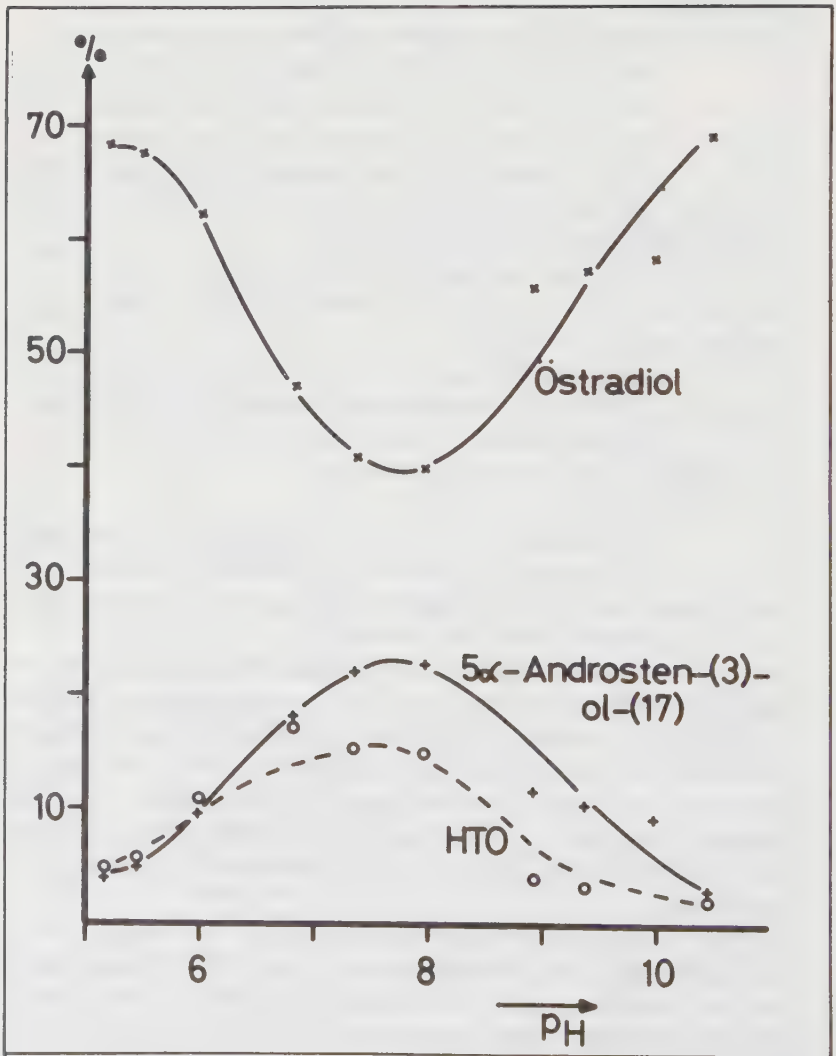


Abb.6: Abhängigkeit der Tritium-Übertragung zwischen Östradiol-17α-T und Androsten-17on vom pH-Wert.

Ansätze: je 100 mg weibliche Rattenleber wurden mit je 4 ml folgender Puffer homogenisiert und mit je 7,0 µMol/l Östradiol-17α-T und je 100 µMol/l Androsten-(3)-on(17) 30 Minuten bei 37°C inkubiert:
pH 5,23 - 6,79 : Sörensen-Phosphat-Puffer
pH 7,3 - 8,98 : Tris-HCl-Puffer
pH 9,53 -10,44 : Na_2CO_3-$NaHCO_3$-Puffer
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität

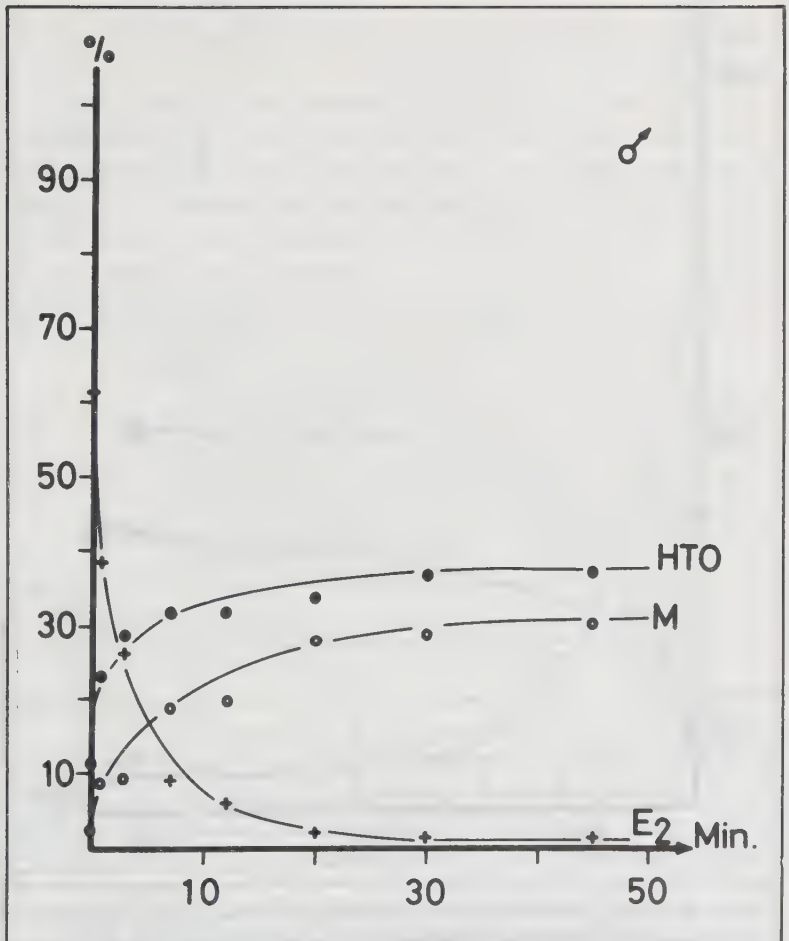


Abb. 7 :Tritiumeinbau aus Östradiol-17α-T(E_2) in HTO und 5α-Androsten-(3)-ol(17)-17-T (M^2) bei Inkubation in Homogenat von Leber männlicher Ratten, zu verschiedenen Zeiten gemessen.

Die Ansätze enthielten 1,7 µCi ≙ 0,54 µMol/l Östradiol-17α-T und 100 µMol/l Substanz 22 in einem Endvolumen von 4,2 ml: 100 mg Leber wurden in 4 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 , homogenisiert. Inkubationstemp.: 37° C

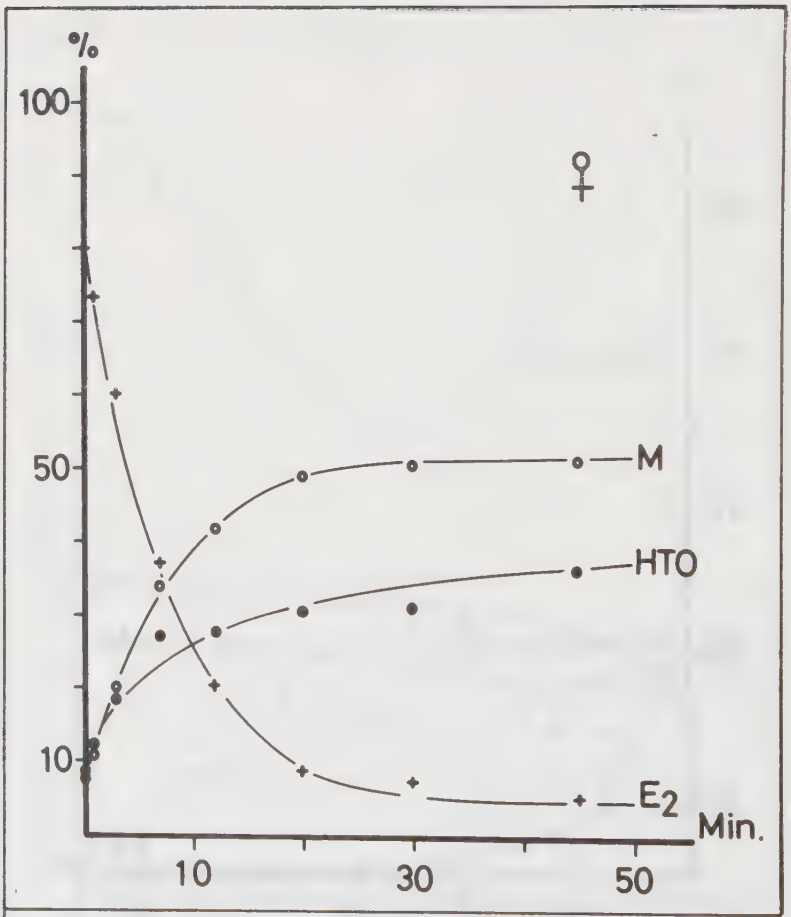


Abb. 8 :Tritiumeinbau aus Östradiol-17α-T (E_2) in HTO und 5α-Androsten-(3)-ol(17)-17-T (M^2) bei Inkubation in Homogenat von Leber weiblicher Ratten,zu verschiedenen Zeiten gemessen.

Die Ansätze waren mit den in Legende zu Abb.7 beschriebenen identisch.Die Identifizierung des Metaboliten (M) erfolgte nach Tabelle 3. Ordinate: % der eingesetzten Aktivität

Leber männlicher Ratten eine höhere Stoffwechsel-Leistung als die weiblicher Tiere.

Betrachtet man dagegen die Tritium-Übertragung auf das Akzeptor-Steroid, so ist diese im Leber-Homogenat weiblicher Ratten bei längerer Inkubation größer als bei den Männchen. Zwar wurde bei beiden Geschlechtern insgesamt gleich viel Östradiol oxydiert, wenn man über 30 Min. inkubierte; dennoch verlief die Oxydation im Versuch mit männlichen Tieren besonders in Homogenaten zuerst rascher als bei weiblichen Tieren.

Tabelle 4 :Tritium-Einbau aus Östradiol-17α-T in HTO und 5α-Androsten-(3)-ol(17)-17-T bei Inkubation von Substanz 22 mit Rattenleber zu verschiedenen Zeiten.

Die Ansätze enthielten 1,7 µCi ≙ 0,54 µMol/l Östradiol-17α-T und 100 µMol/l Substanz 22 in einem Endvolumen von 4,2 ml: 100 mg Leberschnitte in Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4 bzw. Homogenat von 100 mg Leber in Tris-HCl-Puffer, pH 7,45. Inkubationstemp.: 37°C Aufarbeitung der Ansätze vergl. Methodik

% Tritium - Einbau der eingesetzten Aktivität in :

	HTO				Androsten-(3)-ol(17)-17-T			
	Homogenat		Schnitte		Homogenat		Schnitte	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
nach 1 Min.	12,5	23,6	4,1	7,6	10,9	9,1	5,7	6,0
nach 30 Min.	30,8	36,8	50,9	54,5	50,5	28,8	23,4	19,9

Wichtigstes Ergebnis bei diesen Versuchen war, daß im Homogenat weiblicher Rattenleber die Beeinflussung der Östradiol-Oxydation durch die Anwesenheit von Substanz 22 am deutlichsten war(Abb.8)Der hohe Tritium-Einbau in den reduzierten Metaboliten übertrifft die früher(Lit.44,58) für andere Akzeptor-Steroide gefundenen Einbauraten eindeutig. Die Tatsache, daß über 50 % der Tritium-Aktivität, die das Östradiol-17α-T bei seiner Oxydation verliert, in ein anderes Steroid bei dessen Reduktion eingebaut werden, ist ein klarer Beweis für die hohe Spezifität der Reaktion.

Zu 3.: Die Spezifität der Tritium-Übertragung von Steroid zu Steroid wurde besonders deutlich,wenn man die Konzentration des Donators bei gleichbleibender Akzeptor-Konzentration variierte:

Je geringer die Konzentration des Donators Östradiol-17α-T ist, umso höher ist der prozentuale Tritium-Einbau in den Akzeptor-Metaboliten, umso höher ist aber auch die prozentuale HTO-Bildung.

Aus den Abbildungen 9 und 10 geht hervor, daß die Stoffwechselaktivität der männlichen Ratten größer war, d.h. Östradiol-17α-T intensiver oxydiert wurde als in Weibchen , besonders bei den Größenordnungen, die den physiologischen Verhältnissen am ehesten entsprechen (0,05 µMol/l). Bei weiblichen Ratten wurde dagegen bei einer Östradiol-Konzentration bis 30 µMol/l oft mehr als doppelt soviel Tritium in Position 17 von 5α-Androsten-(3)-ol(17) eingebaut wie Tritium-Wasser gebildet wurde. Bei Männchen läuft bei ansteigender Östradiol-Konzentration der Tritium-Einbau in den Metaboliten des Akzeptors und in Wasser fast parallel.

Die Versuche zeigen ferner einen abnehmenden Einfluß von Substanz 22 auf die Östradiol-Oxydation bei steigender Östradiol-Konzentration.

Eine gleiche Versuchsreihe wurde auch mit Substanz 21 durchgeführt.Dabei wurden prinzipiell die gleichen Ergebnisse erzielt.Allerdings wurde meist mehr unoxydiertes Östradiol wiedergefunden als bei Anwesenheit der 3-4-ungesättigten Verbindung.(Vergl.Tabelle 5)

Zu 4.: Der Einfluß der Akzeptor-Steroid-Konzentration auf die Östradiol-Oxydation ist in Abb.11 und 12 dargestellt.

Abb. 11 beweist,daß unter dem Einfluß der Substanz 22 die Oxydationsrate von Östradiol-17α-T um 20 % anstieg.Das dabei vermehrt umgesetzte Tritium wurde ausschließlich zur Reduktion des Akzeptors verbraucht,der Umsatz zu HTO blieb dabei praktisch gleich.

Auch im Homogenat von Leber männlicher Ratten (Abb. 12) wurde die Spezifität der Tritium-Übertragung

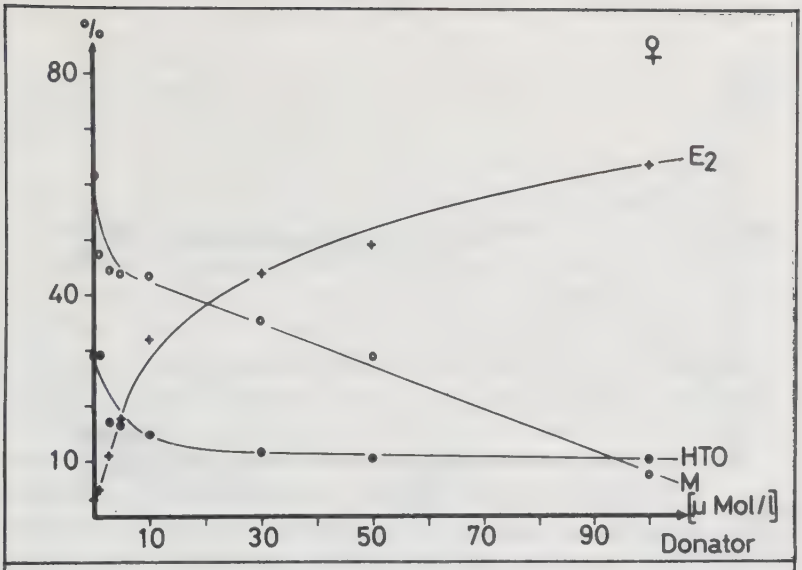


Abb. 9

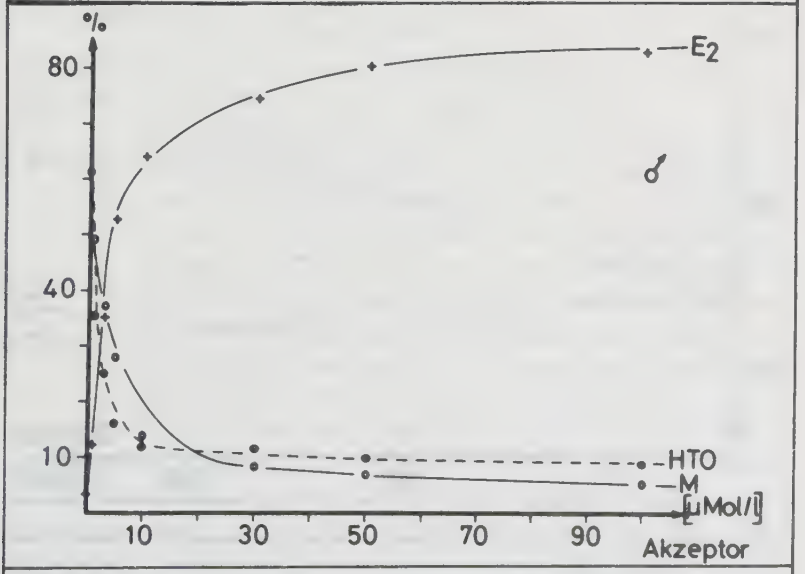


Abb.10

Abb. 9 und 10:
Abhängigkeit des Tritiumeinbaues in Wasser (HTO) und 5α-Androsten-(3)-ol(17)-17-T (M) von der Östradiol-17α-T-Konzentration (Abszisse).

Abb.9:Inkubation mit Homogenat weiblicher Rattenleber (100 mg in 4 ml Tris-HCl-Puffer,pH 7,45) mit Östradiol-17-α-T(E_2) und je 100 µMol/l Substanz 22,30 min. bei 37°C
Abb.10:Analoge Ansätze mit männlicher Rattenleber.

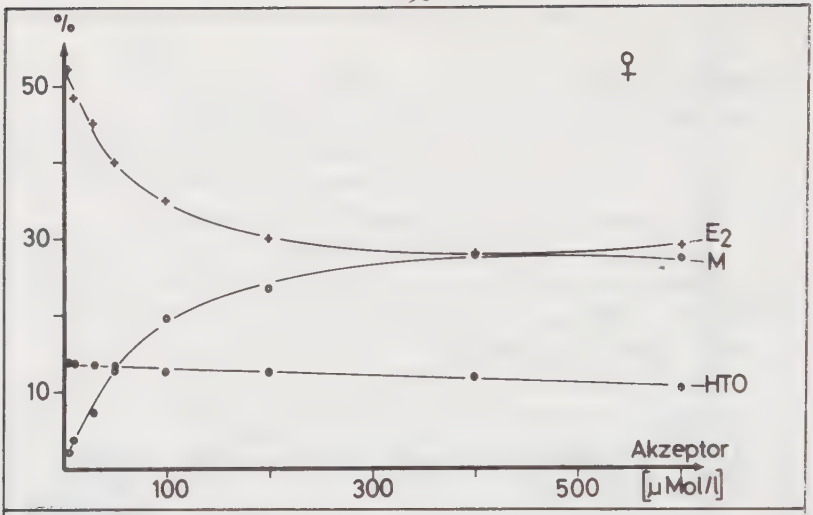


Abb. 11

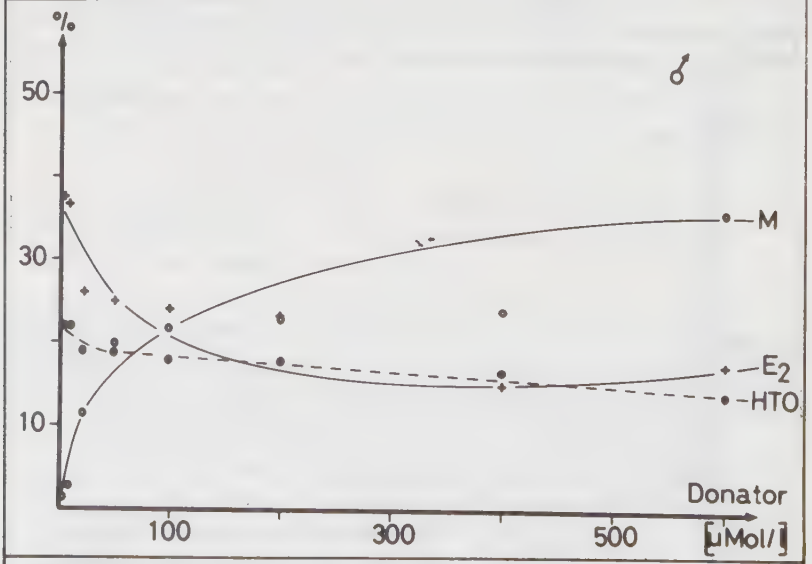


Abb. 12

Abb. 11 und 12:
Abhängigkeit des Tritiumeinbaues in Wasser (HTO) und 5α-Androsten-(3)-ol(17)-17-T (M) von der 5α-Androsten-(3)-on(17)-Konzentration (Abszisse) .
Abb.11:Inkubation mit Homogenat weiblicher Rattenleber (100 mg in 4 ml Tris-HCl-Puffer,pH7,45,) mit 1o,2 µMol/l Östradiol-17α-T (E_2) und Substanz 22,inaktiv,30 Min.bei 37°C.- Ordinate: % der eingesetzten Aktivität
Abb.12: Analoge Ansätze mit männlicher Rattenleber.

und der Einfluß auf die Östradiol-Oxydation durch Substanz 21 und 22 deutlich:

Auch hier wird Östradiol 20 % mehr oxydiert, wenn die Steroide in fünfzigfachem Konzentrations-Überschuß gleichzeitig in der Leber anwesend sind, obschon bei Männchen ohnehin etwa 10 % mehr oxydiert werden als in Weibchen. Da auch hier das Tritium ,das durch Oxydation von Östradiol-17α-T unter dem Einfluß der biologisch unwirksamen Steroide gebildet wurde,eindeutig zur Steroid-Reduktion und nicht zur unspezifischen HTO-Bildung verwendet wurde,ist damit auch für männliche Ratten die Spezifität der Tritium-Übertragung bewiesen.

Der Einfluß von 5α-Androsten-(3)-on(17) auf die Östradiol-Oxydation konnte außerdem noch in Leberschnitten weiblicher Ratten mit Hilfe von ^{14}C-markiertem Östradiol gezeigt werden:

Zu jeder Meßzeit (Abb. 13) wurde mehr Östron und entsprechend weniger Östradiol gefunden, wenn das reduzierbare Akzeptor-Steroid anwesend war.

Die Differenz in der Wiederfindung nicht oxydierten Östradiols betrug in 1-45 Minuten 50-20 %.Die oben für Homogenate beschriebene Mehroxydation bedeutet also den im in-vitro-Versuch erreichbaren Grenzwert: oxydierte und reduzierte Steroide stehen im Gleichgewicht.Interessant ist,daß hier in kurzen Zeiträumen sogar bis 50 % mehr Östron gebildet wurden als normalerweise,die Substanz also sehr schnell reduziert wurde.

Tabelle 5 soll die Wirkung der beiden geprüften Steroide als Tritium-Akzeptoren vergleichen.Dabei schneidet, wenn man die Menge des wiedergefundenen unoxydierten Östradiols betrachtet,5α-Androsten-(3)-on(17) gegenüber 5α-Androsten-(2)-on(17) besser ab,besonders wenn man die Versuche mit Leberschnitten auswertet,die die physiologische Wirklichkeit besser als Homogenate wiedergeben. Bis auf die graduellen Unterschiede verhielten sich die beiden Steroide gleich.

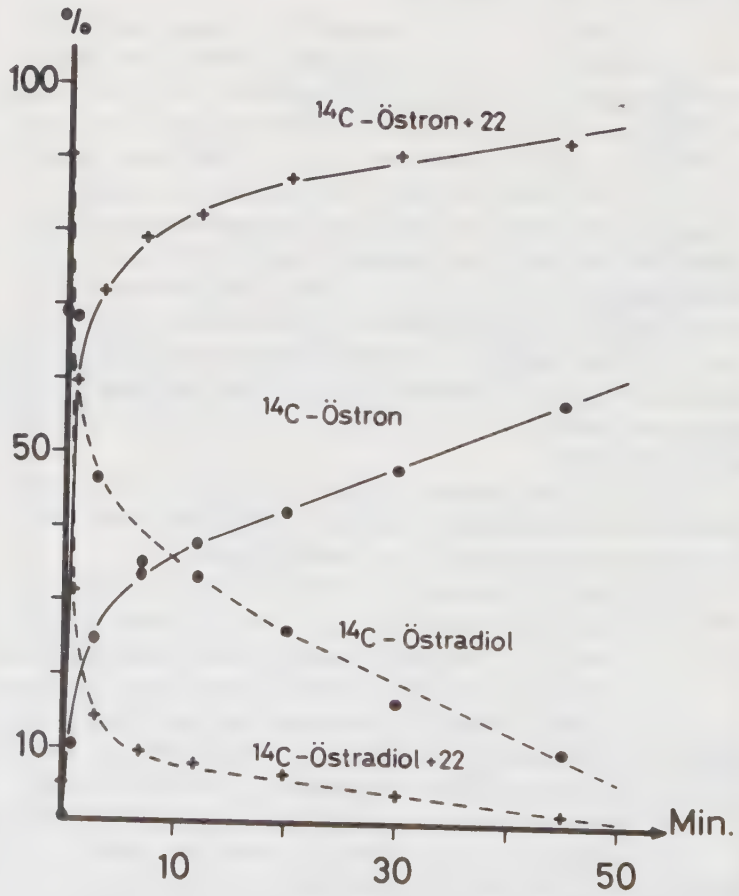


Abb. 13 : Oxydation von ^{14}C-Östradiol zu ^{14}C-Östron bei An- und Abwesenheit von Substanz 22

Inkubationsansätze: je 100 mg Leberschnitte von Rattenweibchen in Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4. Steroidkonzentrationen: 4-^{14}C-Östradiol: 0,112 µCi ≙ 0,5 µMol/l; Substanz 22: 100 µMol/l Ansatzvolumen: 4,2 ml, Inkubationstemp.: 37 °C Ordinate: % der eingesetzten Aktivität

Tabelle 5 :Übersicht über die Wiederfindung der Tritium-aktivität nach Inkubation mit 10,2 µMol/l Östradiol-17α-T und
A. 100 µMol/l 5α-Androsten-(2)-on(17) bzw.
B. 100 µMol/l 5α-Androsten-(3)-on(17)
in Homogenat und in Schnitten weiblicher und männlicher Rattenleber.

Ansätze:a.Homogenate:je 100 mg Leber in 4 ml Tris-HCl-Puffer,pH 7,45 homogenisiert
b.Schnitte:je 1oo mg Leber in Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4
Inkubationszeit: 30 Min.,Inkubationstemp.37° C

	% der eingesetzten Aktivität in:				
	Homogenat		Schnitte		
	♀	♂	♀	♂	
A.	42,4 ± 4,3	21,9	27,6	18,1	Östradiol-17α-T
	20,1 ± 3,8	20,0	24,2	35,7	5α-Androsten-(2)-ol(17)-17-T
	9,8 ± 2,5	21,7	23,2	25,4	HTO
B.	35,0 ± 3,9	24,2	9,6	4,0	Östradiol-17-αT
	19,7 ± 3,5	21,8	30,4	37,9	5α-Androsten-(3)-ol(17)-17-T
	13,0 ± 2,6	18,1	31,2	43,6	HTO

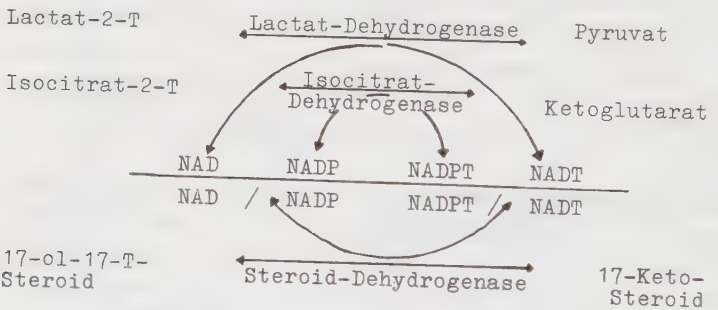
Zusammenfassend läßt sich über die in diesem Kapitel genannten Ergebnisse sagen, daß sie im wesentlichen die von Wenzel et al. gemachten Beobachtungen bestätigen. (Lit. 44,49,58)(Vergleiche Diskussion)

Die Originalität der hier vorgelegten Untersuchungen liegt darin,daß damit die Möglichkeiten einer erheblichen Beeinflussung der Östradiol-Oxydation mit zwei biologisch unwirksamen Steroiden in vitro bewiesen wurde.

C.2.4. Die Selektivität von Östradiol-17α-T als Tritium-Donator im Vergleich zu Lactat-2-T und Isocitrat-2-T

Da für die Reduktion der beiden 17-Keto-Steroide Substanz 21 und 22 innerhalb der Leberzelle auch andere Wasserstoff-Donatoren als das bisher untersuchte Östradiol-17α-T in Frage kommen könnten, wurden zwei solcher Substrate auf diese Fähigkeit geprüft: Lactat-2-T und Isocitrat-2-T.

Beide Salze können bei ihrem Stoffwechsel das Tritium auf Coenzyme übertragen, welche dann ihrerseits bei enzymatischen Reduktionen z.B. von Steroiden das Tritium wieder abgeben können:



Im Versuch wurde Substanz 22 zusammen mit Lactat-2-T bzw. Isocitrat-2-T in Homogenat weiblicher Rattenleber inkubiert, wobei die Konzentration der Donatoren der früher beim Donator Östradiol-17α-T gebrauchten angeglichen wurden.

Abb. 14 b zeigt, daß die Tritium-Aktivität im Bereich des erwarteten 17-ols bei beiden Ansätzen weniger als 0,1 % der eingesetzten Aktivität war. Demnach dienten im Gegensatz zum Östradiol beide Substrate nicht der unmittelbaren Reduktion des Steroids

Welchen Einfluß Lactat als NADH-Lieferant und Isocitrat als NADPH-Lieferant mittelbar hatten, wurde an Unterschieden im Stoffwechsel der ^{14}C-markierten Substanz 22 deutlich (s. Abb 14 a) :

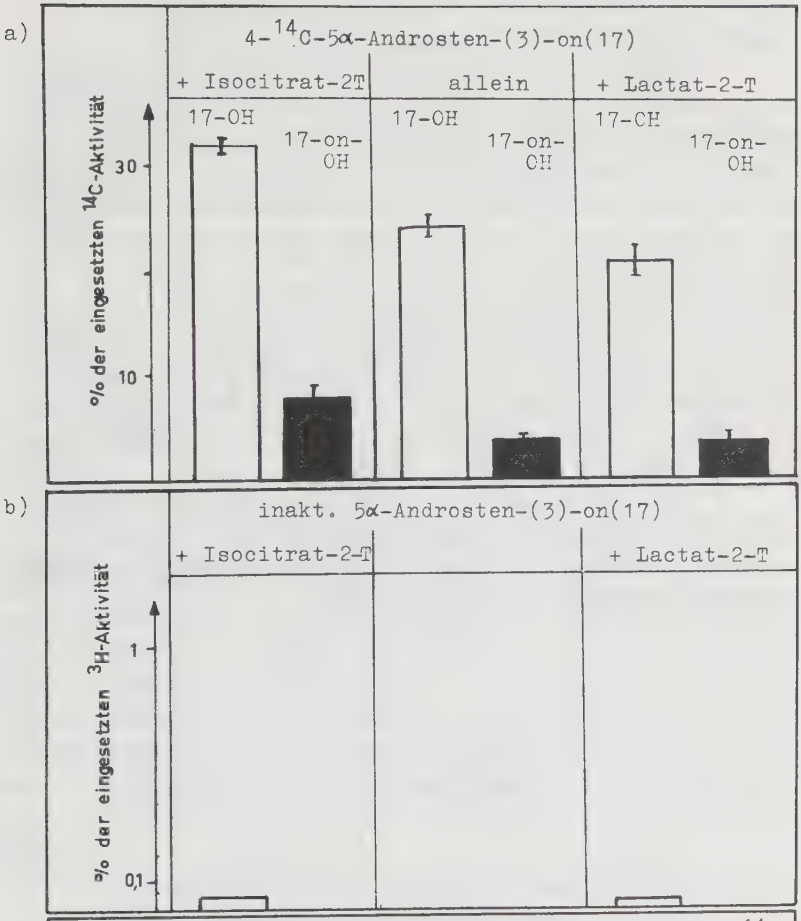


Abb. 14a: Inkubation von 5α-Androsten-(3)-on(17)-4-^{14}C (100 µMol/l) und Isocitrat-2-T (6,2 µMol/l) oder Lactat-2-T (7,7 µMol/l) in Homogenat weiblicher Rattenleber. (Messung mit Fenster) Ansätze: 4,2 ml, 100 mg Leber wurden in 4 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,45, homogenisiert und mit den Substraten 5 Min. bei 37°C inkubiert.
14b: (unten) Die gleichen Ansätze mit nicht ^{14}C-markierten Steroid

Das zugefügte Isocitrat förderte im Vergleich zum Kontrollversuch die Reduktion des Steroids,während Lactat die Reduktion zu hemmen scheint.

Noch intensiver ist der Einfluß des Isocitrats auf die Hydroxylierung von 5α-Androsten-(3)-on(17): Da bei Steroiden Hydroxylgruppen nach dem Prinzip der Oxygenierung mit O_2 und NADPH eingeführt werden,kann das Isocitrat als NADPH-Bildner solche Hydroxylierungen besonders fördern, so daß hier mehr an hydroxyliertem Metaboliten entstehen konnte als sonst.

Die Versuche bestätigen somit indirekt die hohe Spezifität der Wasserstoff-Übertragung von Östradiol-17α-T auf andere,17-Keto-Steroide gegenüber Substraten, welche ebenfalls Wasserstoff an NAD bzw. NADP liefern,wie es Wenzel et al. für andere Steroide und mit anderen Substraten zeigen konnte (Lit. 49,50).

Bemerkenswert ist , daß Isocitrat die Reduktion der 17-Keto-Gruppe verstärkte,ohne daß sein Tritium in das Reduktionsprodukt eingebaut wurde.Die möglichen Gründe für diesen Befund blieben ungeklärt.

C.2.5. Die Gewebespezifität der Tritium-Übertragung

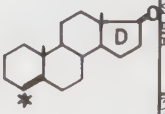
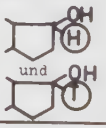
Da die in Abschnitt C.2.3. genannten Versuche einen unterschiedlichen Wasserstofftransfer zwischen Östradiol und 5α-Androsten-(3)-on(17) in der Leber weiblicher und männlicher Ratten gezeigt hatten, wurden auch andere Organe dahingehend untersucht.Besonders interessierten dabei Synthesestätten oder Zielorgane der Steroidhormone.

Um die in der Leber festgestellte Spezifität der Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Androsten-17on mit den Ergebnissen der oben genannten Organe besser vergleichen zu können,wurde nicht der absolute Einbau des Tritiums in das Reduktionsprodukt von Substanz 22 bestimmt. Diese Zahl wird ja nicht nur durch die Spezifität des Östradiol-Wasserstoffs für die Reduktion des 17-Keto-Steroids bestimmt,sondern ebenfalls noch von der Gesamtreduktion des Keto-Steroids in dem betreffenden Organ.Es sollte vielmehr ein Vergleich zwischen dem Anteil des von Östradiol-17α-T auf die Substanz 22 übertragenen Wasserstoffs (meßbar durch Tritium-Markierung) mit dem insgesamt zur Reduktion des 17-Keto-Steroides dienenden,nicht radioaktiven Wasserstoff gezogen und in den einzelnen Organen gegenübergestellt werden.Dies gelingt mit Hilfe einer Doppelmarkierung des Reduktionsproduktes: Östradiol-17α-T gibt sein Tritium bei seiner Oxydation an 4-^{14}C-Androsten-17on ab,wodurch ein doppelmarkiertes Reduktionsprodukt entsteht.

Der Quotient aus der eingebauten Tritium-Menge pro Mol der ^{14}C-Verbindung ist definitionsgemäß die spezifische Aktivität für ^{3}H in der ^{14}C-Verbindung.

Relativiert man die spezifische Aktivität des Tritium-Donators mit 100 %, dann kommt man zur relativen spezifischen Aktivität.Sie ist der zahlenmäßige Ausdruck für das Verhältnis von dem direkt von Östradiol-17α-T stammenden Tritium und dem von anderen Zellsubstraten stammenden Was-

serstoff bei der Reduktion der Substanz 22, wie auch folgendes Schema erklären soll: (Zur Problematik der Technik der Methode und der Metabolit-Abtrennung vergl.die Anmerkung am Schluß des Kapitels)

AKZEPTOR (^{14}C-markiert)	DONATOR	METABOLIT (^{14}C-markiert)	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT absolut (mCi T / mMol) +)	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT relativ (spez.Akt.v. Östradiol-17α-T = 100 %)
	1.Durch unmarkierte Substrate wird nur mit H reduziert	nur:	0	0 %
	2.Durch unmarkierte und markierte Substrate wird mit H und T reduziert +)		z.B.8	10 %
	3.Durch markiertes Substrat,hier Östradiol-17α-T, wird nur mit T reduziert +)	nur:	80	100 %
+) Als Beispiel für ein tritiummarkiertes Substrat als Donator dient Östradiol-17α-T mit der spez.Akt. 8o mCiT/mMol				

Mit Hilfe der Doppelmarkierung wurde zunächst der Einfluß der Steroid-Konzentration auf den Anteil des Östradiol-Wasserstoffs im Vergleich zur Gesamtreduktion des ^{14}C-markierten Androsten-17on im Homogenat weiblicher Rattenleber studiert.

Bei Inkubationen mit konstanter Konzentration des Akzeptors (Substanz 22) und mit unterschiedlicher Konzentration von Östradiol-17α-T fand man selbst bei der geringen Östradiol-Konzentration von 10^{-7} Mol/l eine Tritium-Übertragung auf Substanz 22.Dabei stammten etwa 2% der zur Reduktion von dem 17-Keto-Steroid benötigten Wasserstoffatome vom Östradiol.Bei einer Östradiol-Konzentration von 1oo µMol/l stieg dieser Anteil auf etwa 40 % (Abb.15)

Ferner wurde bei konstanter Östradiol-Konzentration von 0,1 µMol/l die Androsten-17on-Konzentration

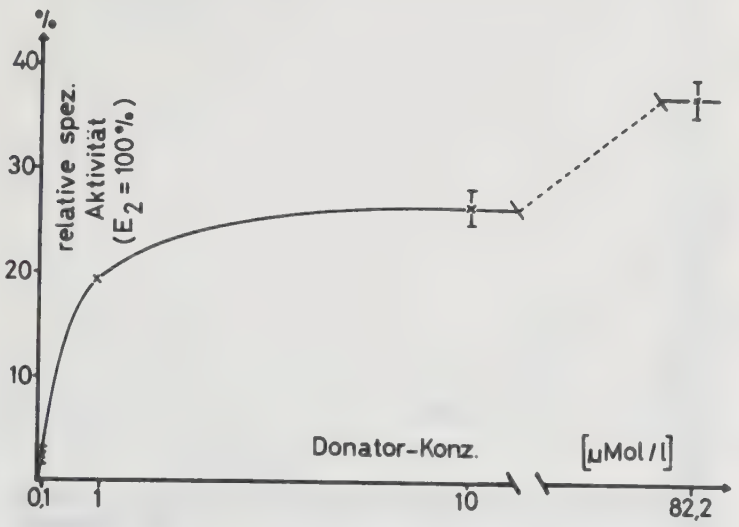


Abb. 15 :Relative spezifische Aktivität des mit Tritium markierten 4-^{14}C-5α-Androsten-(3)-ol(17) bei der Inkubation mit Östradiol-17α-T in Homogenat weiblicher Rattenleber bei Anwesenheit von 5α-Androsten-(3)-on(17) in Abhängigkeit der Östradiol-Konzentration gebildet.

Inkubationsbedingungen vergl. Abb.15
Konzentration von 4-^{14}C-5α-Androsten-(3)-on(17): 0,133 µMol/l
Zur Isolierung des doppelt markierten Metaboliten vergl. Abb. 17,zweiter Absatz.

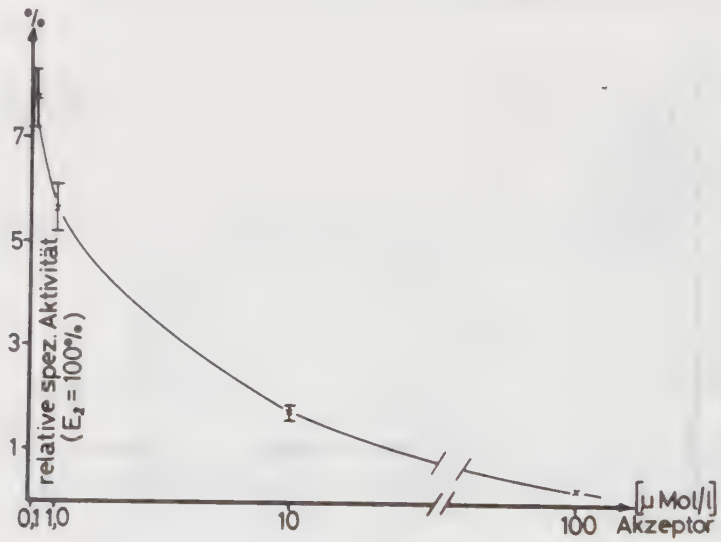


Abb. 16: Relative spezifische Aktivität des mit Tritium markierten 4-^{14}C-5α-Androsten-(3)-ol(17) nach der Inkubation mit Östradiol-17α-T in Homogenat weiblicher Rattenleber in Abhängigkeit von der 4-^{14}C-5α-Androsten-(3)-on(17)-Konzentration gebildet.

Ansätze: 100 mg Leber wurden in 4 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,45, homogenisiert und 7 Minuten bei 37° C inkubiert. Aufarbeitung vergl. Methodik, Isolierung des doppelt markierten Metaboliten vergl. Abb. 17, zweiter Absatz. Östradiol-Konzentration: 0,107 µMol/l

variiert.In der oben beschriebenen Weise wurde auch hier die spezifische Radioaktivität (µCi Tritium pro µMol reduzierter Metabolit) bestimmt. Nach Abb. 16 nahm bei diesen Versuchen die spezifische Aktivität des doppeltmarkierten Metaboliten mit zunehmender Konzentration der Substanz 22 ab. Das vom Östradiol stammende Tritium verdrängte somit,je geringer die Androsten-17on-Konzentration wurde, immer mehr andere,konkurrierende Wasserstoff-Donatoren bei der Reduktion der Substanz 22.

Nachdem mit diesen Versuchen erneut bestätigt wurde,daß das Ausmaß der Wasserstoff-Übertragung von einem Donator auf einen Akzeptor stark von ihrem Konzentrationsverhältnis abhängt und nun auch Angaben über den Anteil des Östradiol-Wasserstoffs an dem Gesamt-Wasserstoff, der zur Reduktion von Substanz 22 nötig ist,für das Lebergewebe vorlagen, wurde sich den anderen am Anfang des Kapitels genannten Organen der Ratte mit entsprechenden Versuchen zugewandt.

Das Maß der Tritium-Übertragung verglichen in den verschiedenen Organen der weiblichen und männlichen Ratte zeigt die Abbildung 17.Die Konzentrationen von Donator- und Akzeptor-Steroid wurde bei allen Organen konstant gehalten.In allen geprüften Organen fand Oxydo-Reduktion statt.In den typischen Stoffwechsel-Organen, der Leber und der Niere,war der Wasserstofftransfer am stärksten.In dem Hormone produzierenden Ovar war der Umsatz noch bemerkenswert,während in dem analogen männlichen Organ,dem Hoden,weder die Reduktion des 5α-Androsten-(3)-on(17) noch die Tritium-Übertragung den Wert des Muskelgewebes erreichte.Da der Hoden als Synthese-Organ des Testosterons über große 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivitäten verfügt,ist dieses Ergebnis unverständlich; die Tatsache wurde aber schon für die reine Tritium-übertragung bewiesen (Lit. 55).

Trotz kaum meßbarer Dehydrogenase-Aktivität (Lit. 56) im Diaphragma,in der Samenblase und in der Prostata bei Ratten, konnte eine geringe Reduktion der Substanz 22 verbunden mit einer Wasserstoff-Übertragung vom Östradiol festgestellt werden.

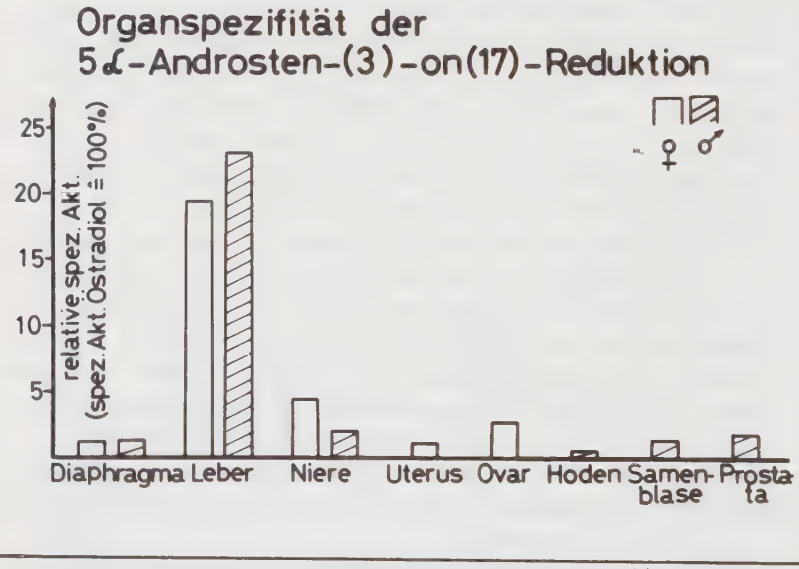


Abb. 17 :Organspezifität der Reduktion von 4-^{14}C-Androsten-(3)-on(17) durch Östradiol-17α-T

Inkubationen: je 100 mg Gewebe in 4 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 30 Minuten bei 37°C
Östradiol-17α-T-Konzentration: 11,7 µCi ≙ 1,7 µMol/l
5α-Androsten-(3)-on(17)-Konzentration: 100 µMol/l

Nach der Isolierung des doppeltmarkierten Metaboliten wurden über die spezifische Aktivität des 5α-Androsten-(3)-on(17)-4-^{14}C (µCi ^{14}C/µMol) aus der ^{14}C-Aktivität die µMole bestimmt. Aus dem Tritium-Anteil im Metaboliten wurde dann die spezifische Aktivität in µCi T /µMol 4-^{14}C-5α-Androsten-(3)-ol(17)-17-T berechnet und auf die spezifische Aktivität des Östradiol-17α-T(=100 %) bezogen. (Ordinate)

Insbesondere aber wurde der doppeltmarkierte Metabolit im Uterus gefunden, dem von Jensen und Jacobson (Lit.10) jegliche Steroid-Dehydrogenase bestritten wird, während Lehmann und Breuer (Lit.11) das Gegenteil feststellen konnten. Diesem Thema wurden daher besondere Versuche gewidmet:

Es wurde im Uterus nichttragender Ratten die Oxydation von 4-^{14}C-Östradiol beobachtet, und zwar bei

An- und Abwesenheit von inaktivem 5α-Androsten-(3)-on(17).

Die Arbeit von Schmidt et al. (Lit.57) über den Einfluß des Cyclus auf Stoffwechselvorgänge im Rattenuterus veranlaßte,die Versuche in allen Cyclus-Phasen durchzuprüfen. Dafür wurden die Tiere mindestens zwei Wochen täglich auf Phasenstand geprüft (Kriterien der Cyclus-Diagnostik s.Methodik A.5.).Erst nach eindeutiger Feststellung der entsprechenden Phase wurden die Tiere getötet und die herauspräparierten Uteri mit den Steroiden inkubiert.Die Versuche führten zu dem in Abb. 18 gezeigten Ergebnis.

Danach zeigte die Aktivität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase eine Cyclus-Abhängigkeit:

Das Maximum liegt beim ersten Tag des Östrus, das Minimum am zweiten Tag des Diöstrus .

Damit ist bewiesen,daß die von Schmidt gezeigte Cyclus-Abhängigkeit für andere Enzymaktivitäten auch für die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase gilt.

Es wurde aber gleichzeitig auch der Einfluß des 5α-Androsten-(3)-on(17) auf die Oxydation des Östradiols bewiesen:

An allen untersuchten Cyclus-Abschnitten war bei Anwesenheit des biologisch unwirksamen Steroids mehr Östradiol zu Östron oxydiert als der Kontrollwert ohne diese Substanz.

Um eine Aussage über den Einfluß von Substanz 22 über alle Cyclus-Phasen hinweg zu machen,wurde einer statistischen Auswertung nur das jeweilige mehr an Östron pro Versuch zu Grunde gelegt: $P = 0{,}001$ $(n=18)$

Mit dieser Analyse ist der Einfluß von 5α-Androsten-(3)-on(17) auf die Östradiol-Oxydation im Uterus bewiesen.

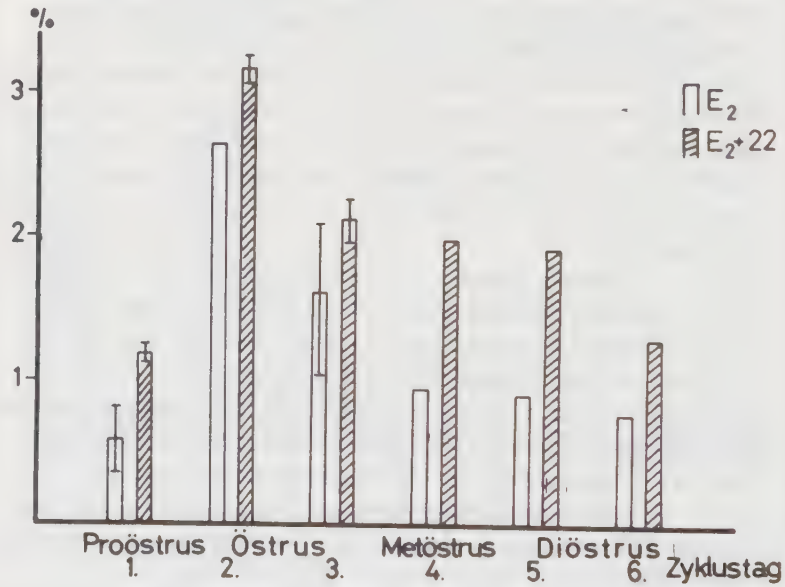


Abb. 18 :Östradiol-4-^{14}C-Oxydation in Abhängigkeit der Cyclus-Phasen im Uterus von Ratten bei An- und Abwesenheit von Substanz 22

Ansätze: je 100 mg Uterus-Gewebe wurden zusammen mit den Steroiden in 4 ml Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 30 Minuten bei 37°C inkubiert.
Steroidkonzentrationen: Östradiol-4-^{14}C (E_2) : 0,088 µMol/l ≙ 0,019 µCi ;
5α-Androsten-(3)-on(17) (22) : 100 µMol/l
Aufarbeitung der Ansätze vergl. Methodik

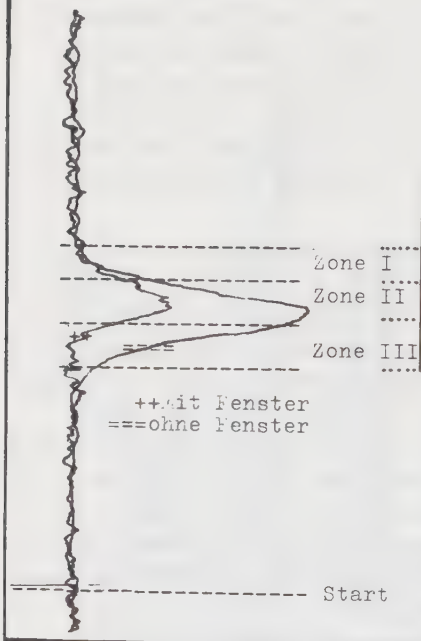
Ordinate: Aus 4-^{14}C-Östradiol gebildetes 4-^{14}C-Östron in Prozent der eingesetzten Aktivität

Anmerkung zur Chromatographie doppeltmarkierter Verbindungen:

Der mit ^{3}H und ^{14}C doppeltmarkierte Metabolit wurde zuerst dünnschichtchromatographisch von den anderen Steroiden abgetrennt und dann rechromatographiert. Damit sollten andere radioaktive Produkte, die mit ihrer Aktivität den $^{3}H/^{14}C$-Quotienten verfälscht hätten, abgetrennt werden.

Bei diesen Chromatogrammen fiel auf, daß die Spitze des die ^{14}C-Aktivität angebenden Maximums (Messung mit Fenster) stets etwa 1-3 mm weiter als die Spitze des die Gesamtaktivität angebenden Peaks (Messung ohne Fenster) vom Start entfernt lagen. Deshalb wurden die Maxima analog Abb. 19 in drei Zonen abgeschabt, vom Kieselgel eluiert und die ^{3}H- und ^{14}C-Aktivitäten im Flüssig-Szintillationszähler gemessen. Dabei traten solche im Bild gezeigten Differenzen auf: Die mit Tritium markierten Moleküle, die ein um zwei höheres Molekulargewicht haben, wanderten eine kürzere Strecke als ^{14}C- und nichtmarkierte Moleküle. Die doppeltmarkierten Moleküle lagen dazwischen.

Um diesen Isotopieeffekt als Fehlerquelle unrichtiger Quotientenbildung nichtig zu machen, war es notwendig, stets den gesamten Aktivitätsbereich abzuschaben von der DC-Platte, um so über alles zu mitteln.



	^{14}C-(IpM)	^{3}H-(IpM)	$^{14}C/^{3}H$
Zone I	312	72	4,3
Zone II	5 123	1 837	2,7
Zone III	458	913	0,5

Abb. 19 :Isotopieeffekt bei doppelt markierten Steroiden auf Dünnschichtplatten.
Chromatogramm von 4-^{14}C-17-^{3}H-5α-Androsten-(3)-ol(17)
++ mit Fenster gemessen: nur ^{14}C
== ohne Fenster: ^{14}C und ^{3}H

C.3. Der Einfluß von Androsten-17on auf den Stoffwechsel des Östradiol in vivo

C.3.1. Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Androsten-17on : Nachweis durch Metaboliten-Analyse im Harn

Um die in den in-vitro-Experimenten bewiesene Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf die Substanz 22 zu untermauern, wurde versucht, den tritiummarkierten Metaboliten aus dem Harn zu isolieren und zu analysieren. Damit wäre dann auch der Wasserstofftransfer zwischen Östradiol und dem biologisch selbst nicht wirksamen Androsten-17on in vivo bewiesen.

Dazu wurden je einer weiblichen und einer männlichen Ratte gleichzeitig intraperitoneal Östradiol-17α-T und Substanz 22 injiziert.

Der in 24 Stunden aufgefangene Urin wurde stufenweise aufgearbeitet (s. Methodik A.3.). So wurde die Aktivitätsverteilung, die über das Schicksal der Steroide Auskunft gibt, festgestellt und folgende schematische Übersichten gebracht: s. Tabellen 6 ♀ und 7 ♂.

Aus diesen Übersichten ist zu entnehmen, daß hinsichtlich der Geschlechter ein deutlicher Unterschied zwischen den möglichen Ausscheidungs-Gruppen der Steroide im Harn bestand. Die Verteilung nach Gefrierdestillation eines Aliquots des ausgeschiedenen Harns war:
bei Männchen: 33,2 % HTO und 66,8 % im nicht destillierbaren Rückstand. Bei Weibchen: 23,9 % HTO und 76,1 % im nicht destillierbaren Rückstand. (Alle bei diesen Ergebnissen genannten Prozentzahlen beziehen sich auf die ausgeschiedene Gesamt-Aktivitätsmenge im Urin = 100 %!)

Der Anteil an hydroxylierten Östradiol-Metaboliten, die hier als Glucuronsäure-bzw. Schwefelsäureester vorlagen, war erwartungsgemäß (Lit. 54) bei Männchen etwas höher als bei Weibchen. Bei diesen war dafür der Anteil an frei extrahierbaren Steroiden höher als bei Männchen.

Tabelle 6 : Ergebnis der Harnaufarbeitung (Aktivitätsverteilung) nach Injektion von Östradiol-17α-T und 5α-Androsten-(3)-on(17) in eine weibliche Ratte.

0,01 mg Östradiol-17α-T ≙ 100 µCi und 10,0 mg 5α-Androsten-(3)-on(17) gelöst in 0,3 ml Äthanol zur i.p. Injektion

Wistar-Ratte, weiblich
Gewicht: 223 g

In 24 Stunden wurden gewonnen:
3,2 ml Urin mit insgesamt 22,4 µCi T
≙ 22,4 % der eingesetzten Aktivität od.
≙ 100 % der ausgeschiedenen Aktivität

Harnextraktion mit Äther/Chloroform 3:1

Freie Steroide, DC, System III :
Verteilung:

Östradiol	R_f 0,28 :	24 %
Östradiol-Metabolit	R_f 0,16 :	12 %
Östradiol-Metabolit	R_f 0,0 :	17 %
		53 %

HTO und konjugierte Steroide

Konjugatextraktion nach Kellie

wäßrige Phase : HTO 24,4%

Konjugierte Steroide

Glucuronide, gespalten:
DC, System III: Verteilung:

Östradiol	R_f 0,28 :	0,2%
Östradiol-Metabolit	R_f 0,16 :	0,1%
Östradiol-Metabolit	R_f 0,0 :	0,4%
		0,7%

Spaltung der Glucuronide mit Ketodase

Konjugatextraktion nach Kellie

Sulfate, gespalten:
DC, System III: Verteilung:

Östradiol	R_f 0,28 :	5,2%
Östradiol-Metabolit	R_f 0,16 :	0,5%
Östradiol-Metabolit	R_f 0,0 :	1,9%
5α-Androsten-(3)-ol(17)	:	3,2%
		10,8%

Hydrolyse mit $HClO_4$

Wiederfindung nach Harnaufbereitung: 88,9 % der ausgeschiedenen Aktivität

Tabelle 7 :Ergebnis der Harnaufarbeitung (Aktivitätsverteilung) nach Injektion von Östradiol-17α-T und 5α-Androsten-(3)-on(17) in eine männliche Ratte.

0,01 mg Östradiol-17α-T ≙ 100 µCi und 10,0 mg 5α-Androsten-(3)-on(17) gelöst in 0,3 ml Äthanol zur i.p.Injektion

Wistar-Ratte, männlich
Gewicht: 245 g

In 24 Stunden wurden gewonnen:
6,5 ml Urin mit insgesamt 37,06 µCi T
≙ 37,06 % der eingesetzten Aktivität od.
≙ 100 % der ausgeschiedenen Aktivität

Harnextraktion mit Äther/Chloroform 3:1

Freie Steroide:DC,System III:
Verteilung:

Östradiol	R_f	0,28:	8 %
Östradiol-Metabolit	R_f	0,16:	22 %
Östradiol-Metabolit	R_f	0,0 :	10 %
			40 %

HTO und konjugierte Steroide

Konjugatextraktion nach Kellie

wäßrige Phase : HTO 35 %

Konjugierte Steroide

Glucuronide,gespalten:
DC,System III:Verteilung:

Östradiol	R_f	0,28:	0,5%
Östradiol-Metabolit	R_f	0,16:	0,3%
Östradiol-Metabolit	R_f	0,0 :	0,1%
			0,9%

Spaltung der Glucuronide mit Ketodase

Konjugatextraktion nach Kellie

Sulfate,gespalten:
DC,System III:Verteilung:

Östradiol	R_f	0,28:	6,5%
Östradiol-Metabolit	R_f	0,16:	2,1%
Östradiol-Metabolit	R_f	0,0 :	2,9%
5α-Androsten-(3)-ol(17)		:	1,8%
			13,3%

Hydrolyse mit $HClO_4$

Wiederfindung nach Harnaufarbeitung: 89,2 % der ausgeschiedenen Aktivität

Die Unterschiede in der Metabolitenbildung durch Veresterung waren aber nur quantitativ, qualitativ fielen bei beiden Geschlechtern die gleichen Metaboliten des Östradiols an, was hier nur dünnschichtchromatographisch anhand gleicher R_f-Werte festgestellt wurde.

Ein Aliquot des vom Weibchen ausgeschiedenen Harns wurde, nachdem die unveresterten Steroide extrahiert waren, der Elektrophorese unterworfen (vergl. Methodik B.5.) Die Messung des Elektropherogramms im Radio-Papierchromatographen ergab von - nach + keine Aktivität durch freie Steroide am Start, ca. 1 % für die Glucuronide (Maximum 3,5 cm v. Start) und ca. 10 % der ausgeschiedenen Aktivität für die Schwefelsäureester (Maximum 10,8 cm v. Start)

Eine Extraktion mit Wasser dieses Abschnittes des Papierstreifens und folgende Säurehydrolyse brachten eine fast gleiche Verteilung der Sulfat-Metabolite wie in Tabelle 6 gezeigt. Als Sulfate lagen hier vor: (DC, System III)

Östradiol	R_f 0,28 : 3,9 %
Östradiol-Metabolit	R_f 0,16 : 0,8 %
Östradiol-Metabolit	R_f 0,0 : 2,0 %
5α-Androsten-(3)-ol(17)	R_f 0,44 : 3,5 %

Der Metabolit des applizierten 5α-Androsten-(3)-on(17) wurde nach dem in Tabelle 3 genannten Schema identifiziert. Von diesem wurde im weiblichen Tier 3,2% bzw. 3,5 %(s.o.) und im Männchen 1,8 % gefunden. Es wurde festgestellt, daß die OH-Gruppe in C-17 ausschließlich mit Schwefelsäure verestert wurde.

Mit der Isolierung dieses tritiummarkierten Metaboliten der Substanz 22 aus dem Harn konnte bewiesen werden, daß eine Wasserstoff-Übertragung vom Östradiol auf das Akzeptor-Steroid auch im lebenden Organismus stattfand. Sie war - entsprechend den in-vitro-Befunden (Tab.5)- bei Weibchen höher als bei Männchen.

Da bei den untersuchten Tieren die Urinmengen, die ausgeschieden wurden, und die darin enthaltene Radioaktivität sehr unterschiedlich waren, konnte keine Aussage über die Geschwindigkeit der Östradiol-Oxydation gemacht werden. Die Verteilung der Metabolite läßt aber darauf schließen, daß das Östradiol im Männchen intensiver verstoffwechselt wurde.

C.3.2. Beschleunigte Östradiol-Oxydation in vivo bei Anwesenheit von Androsten-17on

Durch "stoffwechsel-labile" Markierung mit Tritium gelingt es, die Oxydation von Östradiol am C-Atom 17 im Gesamtorganismus eines Versuchstieres, z.B. der Ratte, durch Aktivitätsmessung des Wassers der ausgeatmeten Luft zu ermitteln (Lit.53). (Vergl. Methodik A.2.)

Es wurde die Mindestoxydation von Östradiol-17α-T in männlichen und weiblichen Ratten ermittelt und im Hauptversuch die Oxydationsgeschwindigkeit des Östradiols bei gleichzeitiger subkutaner Injektion der Substanz 22 untersucht.

a. In männlichen Ratten wurde nach dreieinhalb Stunden 31 % mehr Östradiol als in weiblichen Tieren oxydiert, nach siebeneinhalb Stunden 41 % mehr oxydiert. Anders ausgedrückt: nach dreieinhalb Stunden sind in Männchen 53 %, und nach siebeneinhalb Stunden 81 % des injizierten Östradiol-17α-T oxydiert worden. Diese Ergebnisse stimmen mit den von P.H.Jellinck und Mitarbeitern - mit einer anderen Methode - gefundenen überein (Lit. 54).

Ein Einfluß der Substanz 22 auf die Östradiol-Oxydation in vivo ist bei männlichen nicht nachweisbar, wenn man die Unterschiede statistisch auswertet.

Allerdings wäre eine durch Substanz 22 verursachte vermehrte Östradiol-Oxydation in vivo bei Rattenmännchen denkbar, denn bei der radiospirometrischen Methode bleibt die von den reduzierbaren Steroiden aufgenommene Tritiummenge unentdeckt. Damit wäre effektiv die Oxydationsrate des Östradiols unter dem Einfluß des Keto-Steroids höher, nur nicht in Form von HTO nachweisbar. Die Isolierung solcher tritiummarkierter Metabolite aus einer anderen Körperflüssigkeit, dem Urin , bewiesen dies. (Vergleiche Kapitel C.3.1.)

b. Deutlicher erfaßbar war die Einflußnahme von Substanz 22 auf die Östradiol-Oxydation in weiblichen Tieren.

Nach dreieinhalb Stunden wurde die eingesetzte

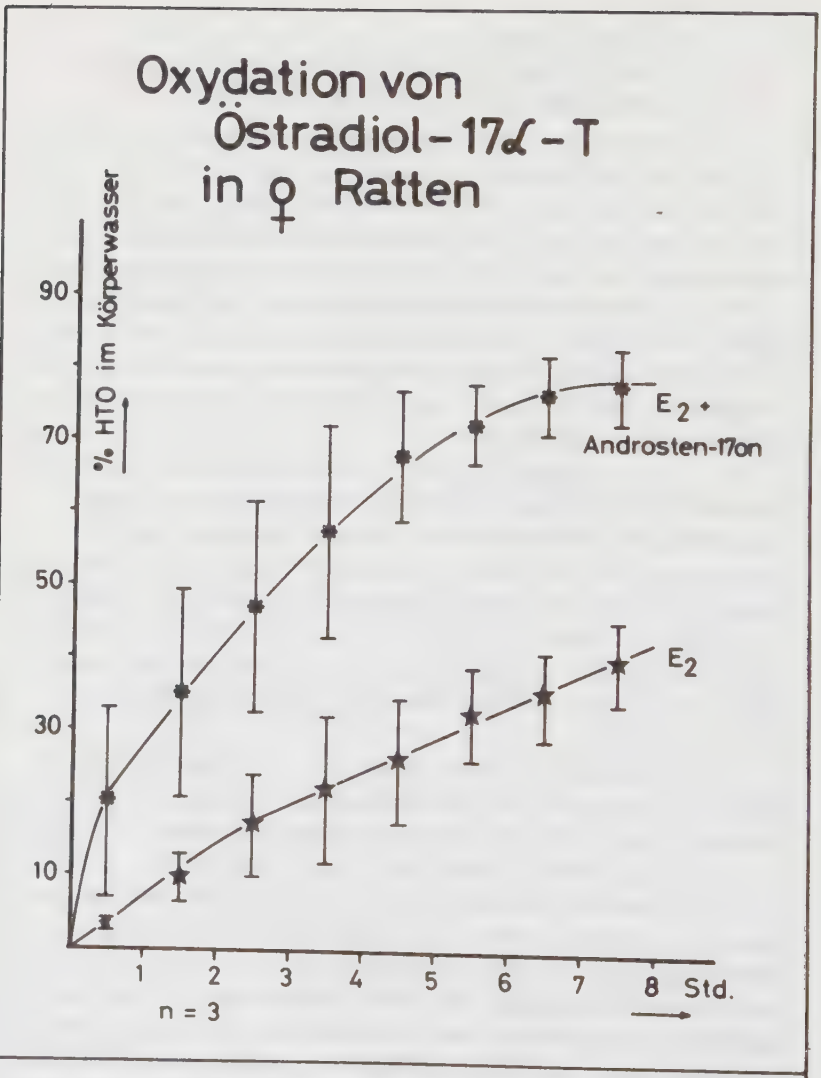


Abb. 20 : Oxydation von Östradiol-17α-T in weiblichen Ratten gemessen durch Radiospirometrie

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der Oxydation am C-Atom 17.
Injektion der in Äthanol gelösten Steroide:
Östradiol-17α-T : 8,4 µg/kg (≙ 70 µCi) (E_2)
5α-Androsten-(3)-on(17) : 30 mg/kg Ratte
je 0,1 ml intramuskulär

Östradiol-17α-T-Menge allein zu 22 % oxydiert. Bei gleichzeitiger Verabreichung von Substanz 22 wurden 57 % HTO gebildet. Die Endwerte des Versuches nach siebeneinhalb Stunden lagen für Östradiol allein bei 40 %, zusammen mit Substanz 22 bei 78 % (s.Abb. 20), P = 0,001 für t=7,5 Std.

Die in den in-vitro-Versuchen mit Rattenleber gefundene Tatsache, daß weibliche Tiere Östradiol langsamer zu Östron und Wasser oxydieren als männliche, wurde hier bestätigt.

Bei der in den ebenfalls in-vitro-Versuchen festgestellten hohen Spezifität der Tritium-Übertragung auf das Akzeptor-Steroid kann mit Sicherheit angenommen werden, daß ein noch größerer Teil der eingebauten Tritiumaktivität als bei den männlichen Tieren in den Metaboliten des Akzeptor-Steroides eingebaut wurde, sich dadurch die Oxydationsrate des Östradiols noch erhöht.

C.3.3. Beeinflusst Androsten-17on die östrogene Wirkung von Östradiol auf den Uterus ?

Da die in-vitro-Versuche gezeigt hatten, daß 5α-Androsten-(3)-on(17) nicht nur in der Leber und der Niere einen Einfluß auf die Östradiol-Oxydation haben kann, sondern auch im Erfolgsorgan des Östradiols, dem Uterus, zur vermehrten Oxydation anregt, sollte auch eine direkte antiöstrogene Wirkung der Substanz 22 geprüft werden.

Dazu wurde der Antiöstrogen-Test nach Dorfman, R.I., Ringold, H.J. und Dorfman, A.S. (Lit.51) modifiziert nach Kessler, W.B. und Borman, A. (Lit.52) durchgeführt. (Vergl. Methodik A.4.)

Üblich ist es den Test mit Östron als Kontrollsubstanz durchzuführen; hier wurde er mit einer der Wirksamkeit entsprechenden geringeren Menge Östradiol versucht.

Das Uteruswachstum der Versuchstiere nach dem dreitägigen Test gibt nachstehende Tabelle an. (Die ausführliche Versuchsbeschreibung und Auswertung vergleiche Methodik A.4.)

Gr.1:reines Lösungsmittel: 8,2 ± 1,8 mg Uterus/10 g Maus
Gr.2:Substanz 22 :10,7 ± 2,4 mg Uterus/10 g Maus
Gr.3:Östradiol :40,o ± 4,1 mg Uterus/10 g Maus
Gr.4:Östradiol + Subst.22:40,9 ± 4,8 mg Uterus/10 g Maus

Die angegebenen Gewichte sind Mittelwerte mit den relativen Standardabweichungen jeder Gruppe mit je 10 Mäusen.Das Körpergewicht aller Tiere nahm in den drei Versuchstagen von durchschnittlich 13,0 auf 16,2 g zu.

Unter östrogenem Einfluß stieg somit das Uteruswachstum auf das fünffache,und zwar unabhängig und unbeeinflusst von der An- oder Abwesenheit des 17-Keto-Steroids.

Eine antiöstrogene Wirkung der Substanz 22 konnte mit diesem Test nicht nachgewiesen werden.(vergleiche Diskussion)

Falls die in-vitro-Befunde auf die Situation in vivo übertragbar wären, müßte das Östradiol bei der Leberpassage,möglicherweise auch in anderen Organen ,z.B. dem Uterus selbst,durch die Testsubstanz soweit oxydiert und hydroxyliert werden, daß das Uteruswachstum nicht mehr stimuliert würde,was an infantilen Mäusen jedoch nicht nachweisbar war.

D. DISKUSSION

Die Arbeit beweist den spezifischen Wasserstofftransfer vom Östradiol auf biologisch unwirksame Steroide sowohl in vitro als auch in vivo.

Dabei zeigte sich eine wesentlich bessere Effektivität des Transfers des Wasserstoffs vom C-17 des Östradiols auf 17-Keto-Gruppen im Vergleich zu 3-Keto-Gruppen im Akzeptor-Steroid.(Vergl.Tabelle 2 und Abb.1)

Der Versuch,Tritium in Homogenat männlicher und weiblicher Rattenleber von Östradiol-17α-T auf andere,im Ring A besonders gut reduzierbare Steroide zu übertragen,mißlang deshalb, weil vermutlich die vom Östradiol gebildeten reduzierenden Coenzyme NADT und NADPT nur in nicht mehr meßbarer Menge zum Ring A gelangten. Die Dissoziation der Coenzyme vom Enzymprotein der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase und Neubindung an Ring-A-Reduktasen war nicht vorhanden.Eine Reduktion der Keto-Gruppe am C-3 durch Östradiol-Wasserstoff bei langsamer reduzierten Steroiden ist bekannt (Lit.45,48) und konnte hier für Androsteron gezeigt werden.

Wurde anstelle von Östradiol-17α-T Ätiocholanolon-3α-T als wasserstoffliefernde Steroid eingesetzt, konnte bewiesen werden,daß Tritium in den Ring A von dort reduzierbaren Steroiden eingebaut wurde.(Vergl.Tabelle 1) 17-Keto-Steroide dagegen wurden kaum mit Hilfe der von Ätiocholanolon gebildeten tritiierten Coenzyme reduziert. Auch hier könnte man einen stabilen Enzym-Coenzym-Komplex annehmen,welcher bevorzugt für lokal definierte Oxydo-Reduktionen am Steroidgerüst zur Verfügung steht.

Die Ursache für die mehr oder weniger enge Kopplung von Oxydo-Reduktionen zwischen Steroiden wird sicher auch durch die sterischen Verhältnisse der in Beziehung tretenden Steroide mit-

bestimmt, da die genannten Oxydo-Reduktasen sämtlich stereospezifisch arbeiten. (Vergl. Einleitung)

Für die weiteren Versuche wurden zwei Steroide mit 17-Keto-Funktion als Akzeptor-Steroide ausgesucht: 5α-Androsten-(2)-on(17) und 5α-Androsten-(3)-on(17).

Während frühere Arbeiten von Wenzel et al. (Lit.49,58) eine spezifische Wasserstoff-Übertragung zwischen biologisch wirksamen Steroiden nachweisen konnten, zeigt diese Arbeit, daß die Spezifität des Wasserstofftransfers erhalten bleibt, selbst wenn biologisch inaktive Steroide als Wasserstoff-Akzeptoren eingesetzt werden.

Auch bei dem hier geprüften System:
Östradiol als Wasserstoff-Donator und
Androsten-17on als Wasserstoff-Akzeptor ist
Östradiol-Wasserstoff gegenüber anderen Wasserstoff-Donatoren wie Lactat oder Isocitrat um den Faktor 1000 bevorzugt.

Allerdings konnten zwei indirekte Wirkungen des Isocitrats auf den Metabolismus von Androsten-17on beobachtet werden: die vermehrte Hydroxylierung und die vermehrte Reduktion am C-17 ohne Isocitrat-Wasserstoff-Einbau. (Vergl. Abb. 14) Unklar bleibt in diesem Zusammenhang, warum die Reduktion an sich durch die Anwesenheit von Isocitrat stärker gefördert wurde, (was mit Hilfe der ^{14}C-Markierung beobachtet wurde) jedoch Tritium von Isocitrat-2-T in das Reduktionsprodukt nicht eingebaut wird.

Die Versuche zur Klärung der Spezifität des Wasserstofftransfers von Östradiol auf die genannten Steroide in Homogenat und in Schnitten von Rattenleber zeigten, daß von dem insgesamt in der Leberzelle zur Reduktion der Keto-Steroide aufgebrachten Wasserstoff je nach dem Konzentrationsverhältnis Donator / Akzeptor 5 - 40 % vom Östradiol stammen. In den anderen geprüften Organen betrug der Anteil des Östradiol-Wasserstoffs 1 - 4 % bei einer Östradiol-Konzentration von 1,7 µMol/l und eiener Akzeptor-Konzentration von 10 µMol/l. Welche Substrate

der Zelle die Differenz zu 100 % an Wasserstoff bei der jeweiligen Steroid-Reduktion aufgebracht haben,konnte bisher noch nicht geklärt werden.Lactat und Isocitrat als Reduktionsmittel kommen,wie gezeigt,nicht in Frage.

Daß der Wasserstoff-Transfer vom Östradiol erst oberhalb einer Östradiol-Konzentration von 1 µMol/l einen Anteil von 20 % an der Gesamtreduktion des 17-Keto-Steroids ausmacht, spricht nicht gegen eine Bedeutung dieser spezifischen Reaktion in der Zelle.So erhöht sich der Anteil bei konstanter Östradiol-Konzentration, wenn die Akzeptor-Konzentration erniedrigt wird.Außerdem kann man über die wahren Konzentrationsverhältnisse innerhalb einer Zelle nichts aussagen.Es ist durchaus vorstellbar, daß sich die Steroide in bestimmten Zellkompartimenten z.B. auf Grund ihrer Lipoidlöslichkeit konzentrieren. An derartigen Zellorten könnte dann ein Wasserstoff-Transfer einen erheblichen Einfluß auf das Gleichgewicht von Hydroxy- und Keto-Steroiden haben, und damit zu einer "Fein-Steuerung" der biologischen Wirkung am Zellort beitragen.

Nach den Untersuchungen von Wenzel et al.(Lit.45) über den Wasserstofftransfer zwischen Östradiol und Androstendion in Lebermikrosomen unter Bildung von Testosteron konnte vermutet werden, daß die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase,die das Östradiol oxydiert, gleichzeitig auch den Wasserstofftransfer bewirkt.

Die Versuche dieser Arbeit entsprechen dieser Ansicht,da z.B. das pH-Optimum der Wasserstoff-Übertragung, der HTO-Bildung aus Östradiol-17α-T und der Östron-Bildung identisch ist.

Hinsichtlich der Tritium-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Androsten-17on wurden deutliche organ- und geschlechtsspezifische Unterschiede gefunden.Die Fähigkeit , Östradiol zu oxydieren war in Weibchen weniger vorhanden als in Männchen, eine Tatsache,die schon von anderen Autoren beschrieben ist(Lit.61,62).

Dagegen wurde festgestellt,daß relativ das Ausmaß der Tritium-Übertragung bei der Oxydation von Östra-

diol-17α-T auf Androsten-17on bei Weibchen größer war als bei Männchen,mithin diese Spezifität größer war.

Wenn aus den in-vitro-Versuchen nur gewisse Schlüsse auf die physiologische Bedeutung der spezifischen Wasserstoff-Übertragung zwischen Steroiden gezogen werden konnten,so bestätigen doch die Ergebnisse der in-vivo-Versuche einige dieser Vermutungen.

So konnte die signifikante Erhöhung der Östradiol-Oxydation bei Gabe von 5α-Androsten-(3)-on(17) in Rattenweibchen festgestellt werden: Unter dem Einfluß des biologisch unwirksamen Steroides stieg nach siebeneinhalb Stunden die Oxydationsrate einer injizierten Östradiol-17α-T-Menge von 39,8 auf 77,8 % an (gemessen durch Radiospirometrie).Dabei wurde nicht nur vermehrt HTO gebildet,sondern auch - wie in den in-vitro-Versuchen - Tritium in den Reduktionsmetaboliten des Keto-Steroids eingebaut,welcher aus dem Harn der Tiere isoliert werden konnte.

Eine antiöstrogene Wirkung von Androsten-17on konnte im Uterus-Wachstums-Test an infantilen Mäusen nicht nachgewiesen werden. Das lag vermutlich daran, daß die Testsubstanz bei der Leberpassage zu schnell verstoffwechselt wurde , um seine Wirkung am Uterus zu entfalten.

Der Uterus selbst zeigte bei Ratten eine vom Cyclus abhängige Dehydrogenase-Aktivität, was an der Oxydation von 4-^{14}C-Östradiol zu 4-^{14}C-Östron festgestellt wurde.(Maximum:erster Östrustag;Minimum:zweiter Diöstrustag)

Mit 5α-Androsten-(3)-on(17) konnte unabhängig von der Cyclus-Phase die Östradiol-Oxydation signifikant erhöht werden.Damit wurde zusätzlich die Anwesenheit der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus bewiesen.

Eine in dieser Arbeit nicht geprüfte Möglichkeit zur Anwendung von biologisch unwirksamen Steroiden wäre die Beeinflussung des Steroidstoffwechsels von hormonabhängigen Tumoren.Diese zeigen neben einer Anreicherung von Östradiol auch eine vermehrte Dehydrogenase-Aktivität. (Lit.6,67,8,9)Bis jetzt wurden in der Therapie in solchen

Fällen androgene Hormone in hohen Konzentrationen gegeben,wonach eine starke Virilisierung der Patientinnen meist ein Absetzen der Medikamente erzwang.

Nach den hier vorgelegten Ergebnissen über die Steigerung der Östradiol-Oxydation mit biologisch unwirksamen Steroiden,müßte es möglich sein, ohne das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen den Stoffwechsel hormonabhängiger Tumoren zu beeinflussen.

E. MATERIAL UND METHODIK

I.Material

1.Tiere:

a.Ratten: männliche und weibliche Wistar-Ratten eigener Zucht, 150-250 g schwer , ca. 8-10 Wochen alt.Ernährung: Altrumin R 10 und Trinkwasser ad libitum.

b.Mäuse : weibliche Albino-Mäuse, 11-17 g schwer, genau 21 Tage alt.Ernährung: Altrumin und Trinkwasser ad libitum.(Zucht : Schering AG)

2.Steroide:

Sämtliche in der Arbeit verwendeten Steroide sind in Tabelle 8 gezeigt;sofern kein Hersteller dort angegeben ist,wurden die inaktiven Steroide von der Schering AG , Berlin , zur Verfügung gestellt. Alle Steroide wurden dünnschichtchromatographisch auf chemische und radiochemische Reinheit geprüft.

Die Herkunft und spezifischen Aktivitäten der ^{3}H- und ^{14}C-markierten Steroide lauten:

Östradiol-17α-T	196 mCi/mMol	Dr.Schulze,Schering
Östradiol-17α-T	98 mCi/mMol	Dr.Schulze,Schering
Östradiol-17α-T	2500 mCi/mMol	Radiochemical Centre
Ätiocholanolon-3α-T	0,193 mCi/mMol	Dr.Bradlow,New York
Östradiol-4-^{14}C	54,4 mCi/mMol	Radiochemical Centre
Androstendion-4-^{14}C	56,6 mCi/mMol	Radiochemical Centre

2a.:Die Herstellung von 5α-Androsten-(3)-on(17)-4-^{14}C erfolgte selbst nach dem von J.McKenna et al.(Lit.40) angegebenen Verfahren: 0,3 mg (≙ 50 µCi) Androstendion-4-^{14}C wurden in 10 ml Eisessig gelöst und bei Zimmertemperatur mit 2 g Zinkstaub,der in vier gleichen Portionen in Abständen von 15 Minuten zugesetzt wurde,geschüttelt.

Nachdem weitere 45 Minuten geschüttelt wurde, wurde vom Zinkstaub abfiltriert und mit etwas Eisessig gewaschen. Dann wurde dem Filtrat Eis zugefügt und genügend 3 N NaOH, um die Säure zu neun Zehntel zu neutralisieren.

Die Mischung wurde mit Essigester extrahiert, der Extrakt im Luftstrom eingeengt und dünnschichtchromatographisch gereinigt. Die spezifische Aktivität blieb unverändert 56,6 mCi/mMol. Die Ausbeute betrug 24 %.

3. Reagentien, Lösungsmittel, Enzyme und Substrate:

Alle Reagentien waren vom Reinheitsgrad pro analysi (E. Merck, Darmstadt). Die organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und vor Licht geschützt aufbewahrt. Die Szintillationschemikalien waren Originalsubstanzen der Fa. Beckman Inc.

Die Ketodase (ß-Glucoronidase) war von der Schering AG, Berlin.

Die beiden ^{3}H-markierten Salze der Milchsäure und der Isocitronensäure hatten folgende Herkunft und spezifische Aktivitäten:

Lactat-2-T 308 mCi/mMol NEN GmbH, Dreieichenhain
Isocitrat-2-T 8,1 Ci/mMol "

Tabelle 8 : Steroide

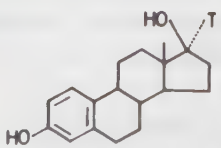
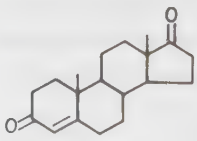
FORMEL	NOMENKLATUR	ZEICHEN
	Östratrien-[1,3,5(10)]-diol-(3,17)-17αT [Ostradiol (auch Östradiol-17-α-T)]	Ö. E_2
	Androsten-(4)-dion-(3,17) (Androstendion)	A

Tabelle 8 : Steroide

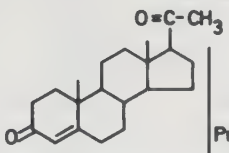
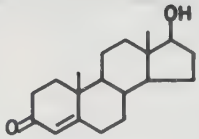
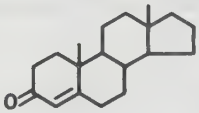
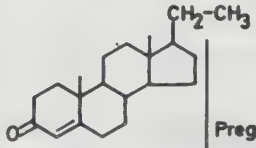
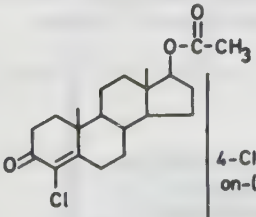
FORMEL	NOMENKLATUR	ZEICHEN
	Pregnen-(4)-dion-(3,20) (Progesteron)	P
	17β-Hydroxyandrosten-(4)-on-(3) (Testosteron)	T
	Androsten-(4)-on-(3)	4A
	Pregnen-(4)-on-(3)	4P
	4-Chlor-17β-hydroxyandrosten-(4) on-(3)-17-acetat (Steranabol)	S

Tabelle 8 : Steroide

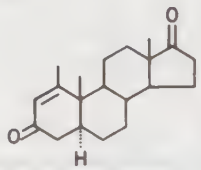
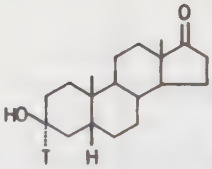
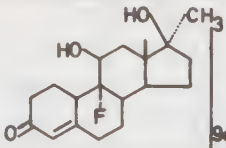
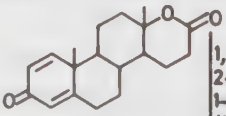
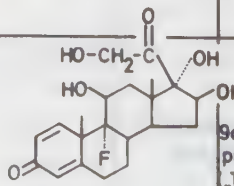
FORMEL	NOMENKLATUR	ZEICHEN
	1-Methyl-5α-androsten-(1)-dion-(3,17)	KM
	3β-Hydroxy-5β-androstanon-(17)-3α-T	Et
	9α-Fluor-11β,17β-dihydroxy-17α-methyl-androsten-(4)-on-(3) („Ultandren" Ciba)	U
	1,2,3,4,4a,4b,7,9,10,10a-Decahydro-2-hydroxy-2,4b-dimethyl-7-oxo 1-phenanthren-propionsäure-δ-lacton ("Δ-1-Testololactone")(„Fludestrin" Squibb)	TA
	9α-Fluor-11β,16β,17α,21-tetrahydroxy-pregnadien-(1,4)-dion-(3,20) („Triamcinolon" Squibb)(Delphicort)	TC

Tabelle 8 : Steroide

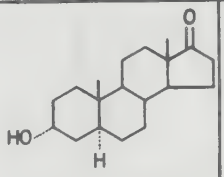
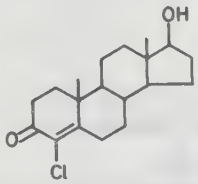
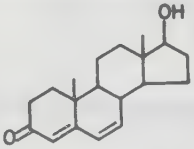
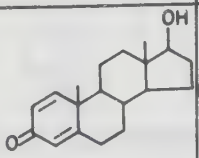
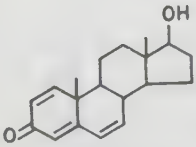
FORMEL	NOMENKLATUR	ZEICHEN
	3α-Hydroxy-5α-androstanon-(17) (Androsteron)	AN
	4-Chlor-17β-hydroxyandrosten-(4)-on-(3)	4Cl
	17β-Hydroxyandrostadien-(4,6)-on-(3)	11
	17β-Hydroxyandrostadien-(1,4)-on-(3)	12
	17β-Hydroxyandrostatrien-(1,4,6)-on-(3)	13

Tabelle 8 : Steroide

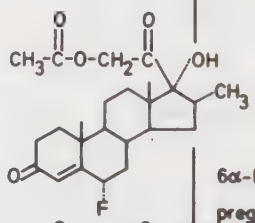
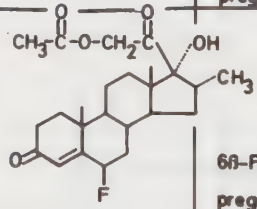
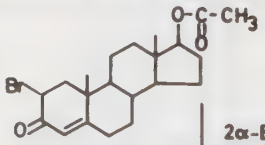
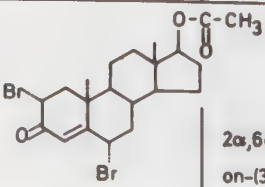
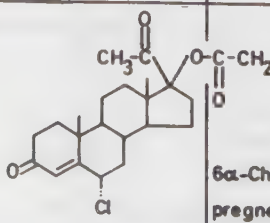
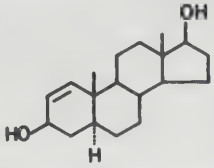
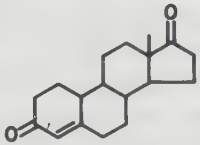
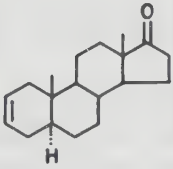
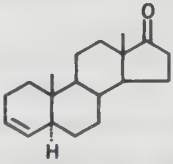
FORMEL	NOMENKLATUR	ZEICHEN
	6α-Fluoro-16α-methyl-17α,21-dihydroxy-pregnen-(4)-dion-(3,20)-21-acetat	14
	6ß-Fluoro-16α-methyl-17α,21-dihydroxy-pregnen-(4)-dion-(3,20)-21-acetat	15
	2α-Brom-17ß-hydroxyandrosten-(4)-on-(3)-17-acetat	16
	2α,6α-Dibrom-17ß-hydroxyandrosten-(4)-on-(3)-17-acetat	17
	6α-Chlor-17α-hydroxy-17-butyryl-pregnen-(4)-dion-(3,20)	18

Tabelle 8 : Steroide

FORMEL	NOMENKLATUR	ZEICHEN
	5α-Androsten-(1)-diol-(3ß,17ß)	19
	19-Nor-androsten-(4)-dion-(3,17)	20
	5α-Androsten-(2)-on-(17)	21
	5α-Androsten-(3)-on-(17)	22

II.Methodik

A. Tierexperimentelle Methoden

1. Inkubationen und Aufarbeitung der Ansätze:

Die Tiere wurden nach Narkotisieren mit Chloroform duch Genickschlag getötet; nach dem Ausbluten wurden die Organe zur Gewinnung von Schnitten bzw. Homogenat entnommen und sofort in entsprechende eiskalte Pufferlösungen überführt.

Zur Herstellung von Schnitten wurden Leber und Niere auf dem Eisblock mit der Rasierklinge in 0,5 mm dünne Scheiben geschnitten(Méthode n.Deutsch,1936). Diaphragma,Samenblase,Prostata und Ovar wurden mit der Schere zerkleinert.Die Testes wurden aus dem Bindegewebsmantel freipräpariert und mit der Rasierklinge zerkleinert; der so gewonnene Gewebebrei wurde zur Inkubation verwendet.Die Uteri wurden der Länge nach aufgeschnitten,zwischen Filterpapier getrocknet und mit der Schere stark zerkleinert.

Zur Homogenat-Herstellung wurde 1,0 g entblutete Leber mit der Schere zerkleinert und in 40,0 ml Puffer unter Eiskühlung mit einem Potter-Homogenisator bei 200 U/Min. homogenisiert. Davon wurden je 4,0 ml entsprechend 100 mg Leber pro Ansatz eingesetzt.

Die Zeit zwischen dem exitus der Tiere und dem Inkubationsbeginn betrug nicht mehr als 15 Min.

Die jeweils in 0,1 ml Äthanol gelösten inaktiven und radioaktiven Steroide bzw. die in 0,1 ml Puffer gelösten Substrate wurden mit den in 4,0 ml Puffer befindlichen Gewebeteilen oder Homogenaten in dicht verschlossenen runden Gläschen von 20 ml Inhalt durchmischt und dann sofort im Warburg'schen Schüttelthermostaten bei 37°C die jeweils angegebenen Zeiten lang geschüttelt.

Danach wurden die Reaktionen durch sofortiges Einbringen der Gefäße in Eiswasser abgestoppt.Der gesamte Inhalt der Gefäße wurde in Zentrifugengläser überführt und mit 3 ml Chloroform nachgespült.Mit dem

Chloroform wurde gleichzeitig der Inkubationsansatz extrahiert, 5 Minuten bei 3 000 U/Min. zentrifugiert und das Chloroform mit einer Pipette vom Boden abgesaugt.Spülen und Extrahieren wurde dreimal mit 3 ml Chloroform wiederholt.Zur Gewinnung der Steroide aus den Geweben wurde schließlich der Überstand abzentrifugiert,das Gewebe homogenisiert und dreimal mit je 2 ml Aceton extrahiert.Diese Zellauszüge und die Chloroformextrakte wurden vereint und im Druckluftstrom bei leichter Erwärmung bis 40°C auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingeengt.

HTO wurde nach Alkalisieren der Überstände mit Natronlauge durch Gefrierdestillation gewonnen.

2.Radiospirometrie:

Die Methode beruht auf der stoffwechsellabilen Markierung eines Stoffes mit Tritium und der Messung von Umsatzquoten im Organismus durch Bestimmung der ^3H-Aktivität im Atemwasser.(l.c.Lit. 53)

Der Bestimmung der Östradiol-Oxydation liegt folgende Reaktionsgleichung zugrunde:

$$\text{Östradiol-17}\alpha\text{-T} + \text{NAD / NADP} \xrightarrow[\text{Dehydrogenase}]{\text{17ß-Hydroxysteroid-}} \rightarrow \text{Östron} + \text{NADT/NADPT} \xrightarrow{\text{Atmungskette}} \text{HTO im Körperwasser}$$

Versuchsanordnung: Den zwei Tage hungernden Ratten wurden die Steroide in äthanolischer Lösung tief intramuskulär injiziert.Je zwei Tiere wurden danach sofort in einen speziellen, zylindrischen Plexiglaskäfig gesetzt, der mit H_2SO_4 und $CaCl_2$ getrockneter Druckluft ständig durchströmt wurde.Der in der Ausatemluft der Tiere enthaltene Wasserdampf wurde in Kühlfallen,die mit flüssiger Luft gekühlt wurden,ausgefroren. Die Kühlfallen wurden in den gewünschten Zeiträumen gewechselt.

Aus den Wasserproben wurde direkt die spezifische Tritiumaktivität in µCi T / ml gemessen(=HTO).

Aus dem Gewicht der Tiere läßt sich das Gesamtkörperwasser berechnen. Es beträgt nach Pace und Rarthbun (Lit.68) 64-68 %. Kennt man die injizierte Radioaktivitätsmenge,so läßt sich die oxydierte Steroidmenge durch Messung der Tritiumaktivität in einer destillierten Körperwasserprobe - hier dem Atemwasser - wie folgt bestimmen:

$$100 \times \frac{\mu Ci \text{ pro ml Körperwasserdestillat}}{\mu Ci \text{ inj.Steroid pro ml Körperwsr.}} = \text{Mindest-Oxydation in \%}$$

3. Harngewinnung bei Ratten und Harnaufarbeitung:

Den Tieren wurden die Steroide in äthanolischer Lösung (0,2 ml) intraperitoneal injiziert.Harn und Kot wurden 24 Stunden lang getrennt gesammelt, indem die Körperöffnungen mit Gummikondomen von 20 ml Inhalt verschlossen wurden.Während des Versuches befanden sich die Tiere in einem engen Käfig,der ihnen keine Fortbewegung ,aber normale Nahrungsaufnahme ermöglichte.

Der auf diese Weise gewonnene Harn wurde nach dem auf Seite 48 angegebenen Schema aufgearbeitet mit Hilfe folgender methodischer Einzelheiten:

Zunächst wurden die freien Steroide mit Äther/Chloroform (3:1,V/V) dreimal extrahiert.

Mit der verbleibenden wäßrigen Phase,in der sich alle konjugierten Steroide befanden,wurde eine Konjugatextraktion nach Kellie (Lit.69) gemacht:

Danach wurde der Harn 50 %ig an festem Ammonsulfat gemacht und die Lösung mit einer Äther/Äthanol-Mischung (3:1) extrahiert (dreimal 1/2 des Original-Volumens).

Die vereinigten Extrakte wurden getrocknet; sie enthielten die gesamten Steroidkonjugate,während in der verbliebenen wäßrigen Phase das durch Steroid-Oxydation gebildete HTO und alle anderen Substrate und Salze verblieben.

Die Konjugatextrakte wurden in einem dem ur-

sprünglichen Harnvolumen entsprechenden Maß an Acetatpuffer (pH 4,8) aufgenommen,welcher 0,4 %ig an Toluol war.Dazu wurden 500 U/ml Ketodase (ß-Glucuronidase) gegeben,und 24 Stunden bei 37°C im Schüttelthermostaten inkubiert.Danach wurden weitere 500 U/ml Ketodase hinzugefügt,und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Der Anteil der nun freien Steroide wurde mit Äther/Chloroform (3:1,V/V) dreimal mit der Hälfte des Volumens extrahiert,die Extrakte vereinigt und bis zur Trockne eingeengt.

Mit der wäßrigen Phase wurde eine zweite Extraktion nach Kellie (s.o.) gemacht,die verbleibenden Steroidkonjugate konnten so bis zur Trockne konzentriert werden.Diese wurde mit dem der Originalharnmenge entsprechenden Volumen Essigester aufgenommen, welcher 0,1 M an wasserfreier Perchlorsäure war.

Die Säurehydrolyse wurde 16 Stunden bei Zimmertemperatur belassen, danach die Hälfte des Volumens dest. Wasser dazugegeben und mit 40 %iger KOH auf pH 8-9 eingestellt. Dabei fiel $KClO_4$ aus. Die Wasserphase wurde zweimal mit Essigester nachextrahiert,die Extrakte über Na_2SO_4 getrocknet und bis zur Trockne eingeengt.Dann wurde 24 Stunden mit einer gesättigten methanolischen $KHCO_3$-Lösung bei Zimmertemperatur verseift,wieder bis zur Trockne eingeengt,der Rückstand mit dem Originalvolumen Wasser aufgenommen und dreimal mit der Hälfte des Volumens Chloroform extrahiert.Der eingeengte Extrakt enthielt die vordem mit Schwefelsäure veresterten Steroide.

Als weitere Methode zur Auftrennung der Steroidkonjugate wurde die Elektrophorese benutzt (s.d.).

Die in den jeweiligen Stufen anfallenden Extrakte wurden fünfmal mit je 0,2 ml Aceton aufgenommen und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

4. Antiöstrogentest an Mäusen:

Der Uterus von Nagern reagiert auf wirksame Östrogene mit Wachstum. Wirksame Antiöstrogene sind in der Lage, das östrogeninduzierte Uteruswachstum zu hemmen. (Lit. 51, 52, 70, 71)

Versuch: Als Tiere dienten 21 Tage alte Mäuse. Die Untersuchungen erfolgten an vier Gruppen mit je 10 Mäusen.

Eine Gruppe erhielt 1,0 γ der Testsubstanz täglich über drei Tage zusammen mit 0,03 γ Östradiol subkutan injiziert. Die Substanzen waren in Benzylbenzoat/Ricinusöl gelöst.

Eine Gruppe erhielt nur Östradiol, eine andere nur die Testsubstanz, und eine weitere erhielt nur das Lösungsmittel appliziert.

Am Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet, und das Gewicht der Uteri ohne Inhalt ermittelt und auf mg/10 g Körpergewicht umgerechnet.

Es wurde die prozentuale Hemmung des Uteruswachstums, bezogen auf die nur mit Östradiol behandelte Kontrollgruppe, ermittelt. Dabei wurde das Uterusgewicht der unbehandelten Kontrollgruppe (Basiswert) von dem entsprechenden Gewicht der Östradiolkontrolle abgezogen. Auf den so erhaltenen Kontrollwert wurden die Werte der Testsubstanzgruppe nach Abzug der Basiswerte bezogen. Die Berechnung der prozentualen Hemmung geschah nach folgender Formel:

$$100 - \left[\frac{(\text{Wert behandelter Tiere}) - (\text{Wert unbehandelter Kontrollen})}{(\text{Wert der Östradiolkontrolle}) - (\text{Wert unbehandelter Kontr.})} \times 100 \right]$$

Die Spezifität des Tests ist umstritten; z.Zt. wird er aber allgemein angewendet.

5.Bestimmung der Cyclusphasen bei Ratten:

Die Ratten wurden mit Äther narkotisiert.Mit einer chirurgischen Pipette wurde die Vagina mehrmals mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült,und ein Tropfen des verdünnten Sekretes sofort auf einen Objektträger gebracht,an der Luft getrocknet und 5 Sek. mit Methanol fixiert. Dann wurde mit Giemsa-Lösung 1:20 25 Minuten gefärbt, mit Wasser gespült,bis keine Farbwolken mehr abgingen,und an der Luft getrocknet.

Die mikroskopische Cyclusdiagnostik anhand des Vaginalabstriches wurde nach folgenden Kriterien durchgeführt:

1.Diöstrus (Ruhepause, 1-2 Tage): Es fanden sich nur spärlich kernhaltige Epithelzellen,einige Leukozyten und Schleim.

2.Proöstrus: Es zeigten sich kernhaltige Zellen, die aus mittleren und oberen Epithelschichten stammten und deren Kerne überwiegend pyknotisch waren.

Der Östrus wurde in ein frühes und ein spätes Stadium eingeteilt:

3. Früher Östrus:Neben kernlosen,keratinisierten Vaginalschollen,meist einzeln liegend, traten noch einige kernhaltige Oberflächenzellen auf.

4.Später Östrus: An zellulären Elementen fanden sich nur Vaginalschollen,die zunehmend zu Verklumpung neigten.Außerdem waren massenhaft Milchsäurebakterien vorhanden.

5.Metöstrus: Verschwinden aller Schollen , Auftreten von basalen Epithelzellen,umgeben von Leukozyten.(Lit. 72)

B. Physikalisch-chemische Methoden

1. Dünnschichtchromatographie und Messung von Radioaktivität auf Dünnschichtplatten

a. Zur Dünnschichtchromatographie wurden die bis zur Trockne eingeengten Extrakte aus Harn und Geweben fünfmal mit je 0,2 ml Aceton aufgenommen und mit der Kapillare auf 0,25 mm dicke, nicht aktivierte Dünnschicht-Fertigplatten Kieselgel F 254 (Glas) (Merck, Darmstadt) aufgetragen.

In folgenden Systemen wurde aufsteigend bei Zimmertemperatur chromatographiert:
(Sämtliche Angaben über Zusammensetzung der Fließmittel beziehen sich auf Volumenteile!)

I. Äther/Dimethylformamid	99+ 1
II. Cyclohexan/Essigester	50+50
III. Chloroform/Aceton	90+10
IV. Cylohexan/Chloroform/Eisessig	70+20+10
V. Benzol/Äthanol	90+10
VI. Methylenchlorid/Eisessig	90+10

b. Die Lage der radioaktiven Steroide wurde durch direkte Aktivitätsmessung mit dem "Dünnschicht-Scanner II" kombiniert mit Autochronschreiber ermittelt (Fa. Prof. Berthold, Wildbad, Lit. 73).

Die Lage der gleichzeitig aufgetragenen, inaktiven Referenzsubstanzen wurde entweder im UV-licht sichtbar gemacht oder durch Ansprühen der DC-Platte mit äthanolischer Schwefelsäure (25 ml Äthanol ad 100 ml conc. H_2SO_4).

Die Aktivitätsgipfel der Kurven wurden quantitativ planimetrisch bzw. mit Hilfe einer besonderen Integrationskurve ausgemessen.

Die Zählausbeuten lagen bei einem Abstand des Dünnschichtzählrohres von 0,5 mm von der Oberfläche der DC-Platte für ^{3}H bei 1,0 % und für ^{14}C bei 25 %, bei Verwendung einer Blende mit Fenster 7 %.

Die Wiederfindung der Steroide aus biologischem Material betrug 85-90 %, die Werte sind nicht korrigiert. Nach Kuss (Lit. 74) ist die Wiederfindung vom Alter der Tiere und damit von der Proteinbindung abhängig.

2.Flüssig-Szintillationsmessung:

Zur Radioaktivitätsmessung reiner Lösungen, definierter Stoffe und des Tritium-Wassers in Dioxan-Szintillationslösung (2,5-Diphenyloxazol 5,0 g , Naphthalin 100,0 g,Dioxan ad 1 l) wurde das Flüssig-Szintillationsmeßgerät Modell LS 150 der Fa.Beckman benutzt.

Für ^{3}H und ^{14}C wurden jeweils verschiedene Energiekanäle benutzt,die Zählausbeute durch externen Standard bestimmt.

3.IR-Spektroskopie:

Zur Aufnahme der IR-Spektren dienten die Spektrographen Perkin-Elmer 237 und 421.Alle Proben wurden in KBr gemessen,die Registrierzeit betrug 2 Std.

4.UV-Spektroskopie:

Zur Bestimmung des Schwundes der 4-en-3-Keto-gruppierung wurden Homogenate ,wie in Abschnitt A.1. angegeben, hergestellt.Neben zwei Hauptansätzen (Steroid +Leberhomogenat,inkubiert) wurden jeweils zwei Ansätze sofort nach Zugabe des Homogenates zur Gewinnung der 100 %-Werte durch Zugabe von 5 ml Äther/Chloroform (3:1,V/V) vor Reaktionen geschützt.

Zur Extraktion der Steroide wurden die Ansätze sowie die 100 %-Werte in Zentrifugengläser überführt,dreimal 2 Minuten mit jeweils 5 ml Äther/ Chloroform geschüttelt und zur Phasentrennung jeweils 5 Minuten bei 3 000 U/Min. zentrifugiert.

Die vereinigten Extrakte wurden im Luftstrom bei 40°C zur Trockne gebracht und in 4,0 ml Methanol zur UV-Spektroskopie gelöst.Das UV-Spektrum dieser Lösung wurde mit einem registrierenden Spektrographen "Zeiss PMQ III" aufgenommen.

Die Extinktionsmaxima der Steroidreste mit erhaltener 4-en-3-Keto-Gruppe erbrachte bezogen auf den 100 %-Wert den 4-en-3-Keto-Schwund.Unter Berücksichtigung des Leberhomogenat-Leerwertes(inkubiertes Homogenat) betrug die Wiederfindung 85-90 % der untersuchten Steroide. (Lit.75)

5.Elektophorese:

Ein Teil des nach Abschnitt A.3. gewonnenen Harns wurde nach Abtrennung der freien Steroide zur Auftrennung der Steroidkonjugate der Elektrophorese unterworfen.

Es wurden 0,5 ml davon auf 4 cm breite und 60cm lange Streifen Spezial-Papier"Macherey und Nagel 214" 10 cm vom Streifenende gleichmäßig aufgetragen. Dann wurde 15 Stunden bei 220 V in 2 N CH_3COOH elektrophoretisch getrennt.(Laufrichtung von - nach +)

Das Elektropherogramm wurde dann sofort bei 60°C im Luftstrom getrocknet und im Radio-Papierchromatographen (Fa.Friesecke und Höpfner) gemessen (Methan-Durchflußzählrohr mit 4π-Zählrohrgeometrie). Der die Sulfate bedeutende Aktivitätsbereich wurde aus dem Streifen herausgeschnitten,zerkleinert,mit Wasser extrahiert und der sauren Hydrolyse unterworfen.

6.Mikrochemische Untersuchungen und Reaktionen:

Zur Identifizierung der Steroide und ihrer Metabolite wurden im Mikromaßstab folgende Methoden benutzt : a. Zur Reduktion wurden die Steroide in 1,0 ml wasserfreiem Methanol gelöst und mit 50 mg Natriumborhydrid bei Raumtemperatur 2 Stunden reduziert.

b. Zur Oxydation wurden die Steroide in 0,2 ml Eisessig gelöst und unter Eiskühlung mit 0,2 %igem Chromtrioxyd in Eisessig versetzt und nach 30 Minuten mit Hexan extrahiert.

c. Zur Acetylierung wurden die Substanzen in 0,05 ml Aceton gelöst und mit 0,05 ml frisch destilliertem Pyridin und 0,05 ml Acetanhydrid versetzt.Die Mischung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann mit Petroläther extrahiert.

Die durch diese chemischen Reaktionen erhaltenen Produkte wurden durch Dünnschichtchromatographie gereinigt und möglichst durch authentische Substanzen verifiziert.

F. ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit sollte versucht werden, die Oxydation von Östradiol zu Östron mit biologisch unwirksamen Steroiden in vitro und in vivo zu beeinflussen.(Versuchstiere:Wistar-Ratten)

Dabei konnte von der von Wenzel et al. gefundenen Tatsache ausgegangen werden,daß Östradiol bei seiner Oxydation in Rattenleber in vitro Wasserstoff auf andere reduzierbare Keto-Steroide (z.B. Androstendion oder Progesteron)überträgt, mithin ein biochemischer Antagonismus zwischen Hydroxy- und Keto-Steroiden besteht.

Versuche zur Klärung der optimalen konstitutiven Bedingungen für die Wasserstoff-Übertragung von Östradiol-17α-T auf Keto-Steroide ergaben eine bessere Reduzierbarkeit von 17-Keto-Gruppen durch Östradiol-Wasserstoff im Vergleich zu 3-Keto-Gruppen.

Daher wurden zwei Steroide mit einer 17-Keto-Funktion als Akzeptor-Steroide für den Östradiol-Wasserstoff ausgesucht: 5α-Androsten-(2)-on(17) und 5α-Androsten-(3)-on(17).

Da diese Steroide selbst keine biologische Wirkung zeigen,waren sie besonders geeignet, ihre Effektivität in Bezug auf die Östradiol-Oxydation in vitro festzustellen und mit ihrem Einfluß in vivo zu vergleichen.

Deshalb wurden beide Steroide in Homogenat bzw. in Schnitten weiblicher und männlicher Rattenleber zusammen mit Östradiol-17α-T inkubiert.

Versuche über die Konzentrationsabhängigkeit zeigten,daß sich noch bei einer Östradiol-Konzentration von 0,05 µMol/l und einer Konzentration des Ketosteroids von 0,01 µMol/l sich dieser Wasserstofftransfer zwischen den Steroiden nachweisen ließ.Dabei stieg der prozentuale Tritium-Einbau im Reduktionsmetaboliten des Wasserstoff-Akzeptors bei fallender Konzentration des Donators Östradiol-17α-T.

Dementsprechend wurde die Oxydation von Östradiol durch die Anwesenheit des 17-Keto-Steroids erheblich verstärkt, was durch Versuche mit ^{14}C-Östradiol gezeigt werden konnte.

Ferner konnte festgestellt werden, daß von dem insgesamt von der Leberzelle zur Reduktion der Keto-Steroide aufgebrachten Wasserstoff bis zu 40 % vom Östradiol stammen können, was die hohe Spezifität der Wasserstoff-Übertragung bewies.

Diese Bevorzugung von Östradiol-Wasserstoff bei der Reduktion anderer Steroide wurde auch dadurch bewiesen, daß andere enzymatische Wasserstoff-Donatoren, wie Lactat und Isocitrat, tausendmal weniger diesen Wasserstoff auf das Reduktionsprodukt von 17-Keto-Steroiden übertragen können.

Diese Untersuchungen zum Wasserstofftransfer zwischen Steroiden wurden auch auf andere Organe der Ratte ausgedehnt. Dabei ergaben sich gewebe- und geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Tritium-Übertragung. Insbesondere wurde dabei im Uterus eine von den Cyclus-Phasen abhängige Oxydation von Östradiol zu Östron festgestellt. Der Einfluß von 5α-Androsten-(3)-on(17) auf die Östradiol-Oxydation war auch hier nachweisbar.

Die in den in-vitro-Versuchen erbrachten Beweise für den Einfluß von 5α-Androsten-(3)-on(17) auf die Östradiol-Oxydation konnte durch in-vivo-Versuche bestätigt werden. Bei gleichzeitiger Injektion beider Steroide in Rattenweibchen konnte durch Radiospirometrie gegenüber den Kontroll-Versuchen eine signifikant vermehrte Östradiol-Oxydation festgestellt werden.

Als Beweis, daß auch in vivo die Keto-Steroide durch Tritium von Östradiol-17α-T reduziert wurden, konnte das tritiummarkierte Reduktionsprodukt aus dem Harn der Tiere isoliert werden.

Der Zusammenhang dieser Befunde über den Einfluß von biologisch unwirksamen 17-Keto-Steroiden auf den Östradiolstoffwechsel mit der Anwendung von Steroiden in der Therapie hormonabhängiger Tumoren wird diskutiert.

G. LITERATUR

1	Kochakian,C.D. und B.R.Endahl	Proc.Soc.exp.Biol. 104, 720 (1960)
2	Kinson,G.A. und C.D. Kochakian	Am.J.of Physiology 206, 443 (1964)
3	Hübner,H. und H. Staib	Biochemie der NNR-Hormone, Thieme-Verlag,Stuttgart 1965
4	Forchielli,E. und R.I. Dorfman	J.Biol.Chem. 223, 443 (1956)
5	Leybold,K. und Hj. Staudinger	Biochem.Zeit. 331, 389 (1959)
6	King,I.B.,Parmattoni,M., Gordon,I. und R.Baker	J.Endocrinol. 33, 127 (1965)
7	Bacigalupo,G. und H. Lingk	Arch.f.Geschwulstforschg. 32,1-2, 95 (1968)
8	Breuer,H.	Zeitschr.f.Krebsforschg. 67, 247 (1965)
9	Deshpande,N.,Jensen,V. und R.B. Bulbrock	Steroids 10:3,219 (1967)
10	Jensen, E.V.	Dtsch.med.Wschr. 88,24, 1229 (1963)
11	Lehmann,W.D. und H. Breuer	Naturwissenschaften 55, 182 (1968)
12	Breuer,H.	in:Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiolog.und patholog.Analyse,10.Auflg. Springer-Verlag,Heidelbg.1964 6 a, 423
13	Dorfman,R.I. und Ungar,F.	Metabolism of Steroid Hormones,Burgess Publ.Comp. Minneapolis 1953
14	Staudinger,Hj. und Steck,G.	Flaschenträger/Lehnartz 2/1 b, 869 (1954)
15	Samuels,L.T.	Progr.in Chem.of Fats and other Lipids 3, 365 (1955)

16	Abraham,R. et al.	Hydroxylasen in Hoppe-Seyler/Thierfelder S. 917 (s.Lit.12)
17	Tomkins,G.M.	J.of Biolog.Chem. 218, 437 (1956)
18	Hurloch,B. und Talalay,P.	Arch.Biochem. 80, 468 (1959)
19	Hurloch,B. und Talalay,P.	J.ofBiolog.Chem. 233, 886 (1958)
20	Langer,L.J. und L.L. Engel	J.of Biolog.Chem. 233, 583 (1958)
21	Langer,L.J.,Alexander, J.A.und L.L. Engel	J.of Biolog.Chem. 234, 2609 (1959)
22	Jarabak,J.,Adams,J.A., H.G.Williams-Ashman und P.Talalay	J.of Biolog.Chem. 237, 347 (1962)
23	McGuire,J.S.jr. und G.M. Tomkins	J.of Biolog.Chem. 235, 1634 (1960)
24	McGuire,J.S.jr.,V.W. Hallis u.G.M.Tomkins	J.of Biolog.Chem 235, 3112 (1960)
25	Leybold,K. und Hj.Staudinger	Arch.Biochem. 96, 629 (1962)
26	Leybold,K. und Hj. Staudinger	Med.exp.,Basel 2, 46 (1960)
27	Leybold,K. und Hj. Staudinger	Biochem. Z. 331, 399 (1959)
28	Tomkins,G.M.	J.of Biolog.Chem. 225, 13 (1957)
29	Yates,F.E.,Herbst,A.L. und I.Urquart	Endocrinology 63, 887 (1958)
30	Troop,R.C.	Endocrinology 64, 671 (1959)
31	Rao,L.G.S. und W. Taylot	Biochem.J. 90, 30 (1964)
32	Schriefers,H.,Cremer, W. und M.Otto	Z.Physiolog.Chem. 348, 183 (1967)
33	Conney,A.H. und I.A. Klutsch	J.of Biolog.Chem. 238, 1611 (1963)

34	Stone,G.M.	Acta endocrinolog. 47, 433 (1964)
35	Sodomann,C.P. und H. Breuer	Acta endocrinolog. 59, 397 (1968)
36	Tomkins,G.M.	Rec.Proc.Hormone Res. 12, 125 (1956)
37	Karlson,P.	Lehrbuch der Biochemie, 5.Auflage, (1960) Georg-Thieme-Verl.,Stuttgart
38	Lehmann,W.D. und H. Breuer	Z.Physiolog.Chem. 350, 191 (1969)
39	Hecker,E. und G.Farthofer-Boeckh	Biochem.Z. 338, 628 (1965)
40	Hagermann,D.D. und C.A.Villee,N.Hosoya	Biochem.J. 76, 297 (1960)
41	Rongone,E.L.	Arch.of Biochem.and Biophys. 98, 292 (1962)
42	Ringold,H.J.,Ramachandran,S.u. E.Forchielli	Biochim.Biophys.Acta 82, 143 (1964)
43	Merz,K.W.	Grundlagen der Pharmakologie, Wissenschfl.Verlagsges. Stuttgart,1965, S. 203
44	Wenzel,M. und K. Pollow	Z.Physiolog.Chem. 348, 1667 (1967)
45	Wenzel,M. und S. Wolf	Z.Physiolog.Chem. 350, 1203 (1969)
46	Dorfman,R.I.	Steroids 3:5, 675 (1964)
47	Neumann,F. Schering AG	Persönliche Mitteilung
48	McKenna,I.,Norymberski, J.K.und R.D.Stubbs	J.Chem.Soc. Jul./Aug. 1959, S. 2502
49	Wenzel,M. und K.Pollow	Biochim.Biophys.Acta 152, 431 (1968)
50	Wenzel,M.,K.Pollow und T.Ziebarth	Zeitschr.f.Naturforschg. 22 b , 8 (1967)
51	Dorfman,R.I.,Ringold,H.I. und A.S. Dorfman	Endocrinology 68, 17 (1961)

52	Kessler,W.B. und A. Borman	Ann.N.Y.Academ.Sci. 71, 486 (1966)
53	Wenzel,M.,Kleucker,H. und P.E.Schulze	Z.Naturforschg. 21 b, 1178 (1966)
54	Jellinck,P.H. und J.Woo	J.Endocrinol. 39, 99 (1967)
55	Pollow,K.	Dissertation, FU Berlin, 1970
56	Kochakian,C.D.,B.R. Carroll und B.Uhri	Am.J.Physiolog. 189, 78 (1957)
57	Schmidt,H.,Noack,I., Walther,H.undK.D.Voigt	Acta endocrinolog. 56, 231 (1967)
58	Wenzel,M.,Langold,M. und P. Hallac	J.Biolog.Chem. 244, 4523 (1969)
59	Mueller,G.C.	in:Karlson,P.(Ed.) Mechanism in Hormone Action Thieme-Verlag,Stuttg.1965
60	Hagermann,D.D.	Endocrinology 76, 553 (1963)
61	Jellinck,P.H. und J.Lucieer	J.Endocrinology 32, 91 (1965)
62	Kuntzman,R.,M.Jacobson, K.Schneidman u.A.H.Conney	J.Pharmacol.Therapeut. 146, 280 (1964)
63	Remmer,H.	Naturwissenschaften 46, 580 (1959)
64	Remmer,H.	Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol.exp.Pathol. 235, 279 (1959)
65	Wenzel,M.	Unveröffentl.Arbeit
66	Kuntzmann,R.,Welch,R. und A.H.Conney	Advances in Enzyme Regul. 4, 149 (1965)
67	Breuer,H.,Breuer,J. und D.Schmähl	Zeitschr.f.Krebsforschg. 67, 247 (1965)
68	Pace,N. und E. Rathbun	J.of Biol.Chem. 158, 667 (1945)
69	Kellie,A.E. und A.P. Wade	Biochem.J. 66, 196 (1957)
70	Edgren,R.A. und D.W. Calhoun	Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.) 94, 537 (1957)

71	Evans,I.S.,Varney,R.F. und F.C. Koch	Endocrinology 28, 747 (1941)
72	Zarrow,M.X.,Yochim,J.M. und J.L.McCarthy	Experimental Endocrinology Academic Press, New York-London,1964
73	Wenzel,M. und P.E. Schulze	Tritium-Markierung Verlag W.de Gruyter & Co., Berlin,1962
74	Kuss,E.	Z.Physiolog. 349, 1234 (1968)
75	Gerhards,E.,Raspé,G. und R.Wiechert	Arzneimittel-Forschung 17, 431 (1967)

LEBENSLAUF

Am 16.Dezember 1941 wurde ich als Sohn des Bankkaufmannes Gustav Mützel und seiner Ehefrau Margareta,geb. Weymann, in Berlin geboren.

Nach sechsjähriger Grundschulzeit in Zehlendorf besuchte ich ab Ostern 1954 die Schadow-Schule (Humanistisches Gymnasium).Dort bestand ich am 3.März 1961 die Reifeprüfung.

Meine Berufsausbildung als Apotheker begann ich mit der zweijährigen Praktikantenzeit am 1.4.1961 in der Schäfers-Apotheke in Berlin. Vor dem Berliner Prüfungsausschuß bestand ich am 12.3.1963 das Vorexamen.

Das Studium der Pharmazie begann ich im April 1965 an der Technischen Universität Berlin. Nach dem Wechsel im Sommer-Semester 1966 an die Freie Universität bestand ich am 10. April 1968 vor dem Prüfungsausschuß in Berlin die Pharmazeutische Prüfung.

Im Anschluß an meine halbjährige Tätigkeit als Kandidat in der Tasmania-Apotheke,Berlin, begann ich im November 1968 unter Leitung von Herrn Prof.Dr. M. Wenzel mit vorliegender Arbeit.

Zum 1.5.1969 erhielt ich die Approbation als Apotheker.

Am 29.August 1969 schloß ich die Ehe mit der Apothekerin Friederike Wecks.